Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. A. Hirsch

Stoffwechsel des Δ^5-3ß, 17ß-Androstendiols in der menschlichen Placenta in vitro

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
ELFRIEDE WECKER
geb. Röhm
aus Sulz a. E./Krs. Calw

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0053

Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. A. Hirsch

Stoffwechsel des Δ^5-3ß, 17ß-Androstendiols in der menschlichen Placenta in vitro

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
ELFRIEDE WECKER
geb. Röhm
aus Sulz a. E./Krs. Calw

1986

Dekan: Professor Dr. W. Schulte
1. Berichterstatter: Professor Dr. A. E. Schindler
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. W. Rosendahl

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung 3
II. Literaturüberblick 5
2.1. Δ^5-Androsten-3β,17β-diol (17β-Androstendiol) 5
2.2. 17β-Androstendiol als Zwischenprodukt im Δ^5-Stoffwechselweg bei der Synthese der C_{19}-Steroide in den endokrinen Drüsen .. 5
2.3. Herkunft und Vorkommen des 17β-Androstendiols im Plasma .. 6
2.4. Bedeutung des 17β-Androstendiols im menschlichen Stoffwechsel 9
2.4.1. Bedeutung des 17β-Androstendiols als Prekursor der Östrogene in der Schwangerschaft 9
2.5. Aromatisierung der Androgene 15
2.5.1. Chemischer Ablauf der Aromatisierungsreaktion 16
2.5.2. Orte der Östrogensynthese 19
III. Eigene Untersuchungen 19
3.1. Grundzüge der Untersuchungen 19
3.2. Material 19
3.2.1. Lösungsmittel und Pufferlösung 19
3.2.2. Kristalline Steroide 21
3.2.3. Radioaktive Steroide 21
3.2.4. Untersuchte Gewebe 22
3.3. Methode 24
3.3.1. Vorbereitung der Versuche 24
3.3.2. Inkubation 24
3.3.3. Extraktion der Steroide 25
3.3.4. Auftrennung und Reinigung der Steroide durch Dünnschichtchromatographie 26
3.3.5. Acetylierung der Steroide 29
3.3.6. Kristallisation der Steroide 30
3.3.7. Messung der Radioaktivität 32
3.3.8. Berechnung der Umwandlungsraten 33
3.3.9. Proteinbestimmung 35
IV. Ergebnisse der Untersuchungen 36
V. Interpretation der Ergebnisse 78
VI. Diskussion 84
6.1. Verstoffwechselung des 17β-Androstendiols 86
6.2. Umwandlung von Testosteron zu Östradiol 88
6.3. Umwandlung von Testosteron zu Androstendion 88
6.4. Umwandlung von Androstendion zu Östron 90
6.5. Umwandlung von Östradiol zu Östron 90
VII. Zusammenfassung 93
VIII. Literaturverzeichnis 95

I. Einleitung

Seitdem Beatson[16] im Jahre 1896 in seinem Aufsatz "On the Treatment of inoperable Carcinoma of the Mamma: Suggestions for a new Method of Treatment, with illustrative Cases" über die Regression zweier metastasierender Mammacarcinome nach Ovariektomie berichtet hat, ist die Frage, ob Hormone die Entstehung oder das Wachstum von Tumoren beeinflussen können, Gegenstand vieler Untersuchungen geworden.
Boyd[26] konnte schon im Jahre 1900 - diese Beobachtungen wurden in neuerer Zeit bestätigt[84] - zeigen, daß nur bei etwa einem Drittel aller Ovariektomien eine Tumorregression erzielt werden kann. Zusätzliche ablative Therapien wie Hypophysektomie und Adrenalektomie erbrachten ähnliche Ergebnisse.[85] Auf der Suche nach der Ursache dieser unterschiedlichen Reaktionsweisen gelang es Allen et al.[5] aufzuzeigen, daß das Verhältnis der Abbauprodukte der Androgene (17-Ketosteroide) zu dem Anteil der zu 11-Hydroxy- bzw. 11-Keto-17-Ketosteroide abgebauten Corticosteroide bei Patientinnen, die auf eine ablative Therapie mit einer Tumorregression reagierten, höher war als bei denjenigen, bei denen der operative Eingriff keinerlei Erfolg zeigte. Diese Ergebnisse konnten trotz einiger anderslautender Untersuchungsresultate im wesentlichen bestätigt werden.[86] Bulbrook et al.[36] beschrieben dann 1971, daß an Brustkrebs erkrankte Frauen bis zu 9 Jahren vor Ausbruch der Erkrankung erniedrigte Mengen an Ätiocholanolon, einem Abbauprodukt des Dehydroepiandrosterons [141,147], ausscheiden.
Desphande et al.[46] wiesen nach, daß bei Patientinnen mit Mammacarcinom eine positive Korrelation zwischen den 17-Ketosteroiden im Blut und den 17-Ketosteroiden im Urin besteht, und Bulbrook et al.[35] sowie Poortman et al.[170] zeigten, daß die erniedrigten 17-Ketosteroide im Urin in hohem Maße mit den Sekretionsraten des Dehydroepiandrosterons bzw. dessen Sulfat korrelieren. Diese Ergebnisse wurden durch die von Wang und Herian[232] und von Brownsey et al.[34] beschriebenen Untersuchungen über erniedrigte Dehydroepiandrosteronsulfat-Plasmaspiegel bei Frauen mit metastasierendem Mammacarcinom ergänzt.
Da Poortman et al.[170] weiter zeigen konnten, daß Androstendion bei Krebspatientinnen in ungefähr der gleichen Konzentration vorliegt wie bei gesunden Frauen und die Umwandlungsrate zu Östron nicht verändert war, lag es

nahe, zumal Dehydroepiandrosteronsulfat der bei weitem wichtigste Prekursor der 17-Ketosteroide ist[144], die verminderten Ausscheidungsraten der 17-Ketosteroide mit einer Erniedrigung des Dehydroepiandrosteronsulfats im Plasma in Verbindung zu bringen. Da nun ausführliche Untersuchungen darüber vorliegen, daß Tumore, die auf eine ablative Therapie ansprechen, über spezifische Östradiolrezeptoren verfügen[62,104,135] und damit im Sinne von Jensen et al.[103] sog. 'target tissues' darstellen, wurde von Poortman et al.[171] die These aufgestellt, daß die bei Carcinompatientinnen beobachteten erniedrigten Dehydroepiandrosteronsulfat-Spiegel durch die Interaktion dieses Hormons bzw. seiner Metaboliten mit den Östradiolrezeptoren des Tumors bedingt sein könnten. Untersuchungen von Poortman et al.[171] zeigten, daß Δ^5-Androsten-3β,17β-diol, ein Metabolit des Dehydroepiandrosterons[113,176], eine hohe Affinität zum Rezeptor besitzt: bei normalen Plasmakonzentrationen verdrängt es ungefähr die Hälfte des gebundenen Östradiols vom Rezeptor, wohingegen Dehydroepiandrosteron, Dehydroepiandrosteronsulfat und die Metaboliten Androstendion und Testosteron keine, bzw. bei unphysiologisch hohen Dosen geringe Affinität zum Rezeptor aufweisen.

Die Frage, ob die Konkurrenz des Δ^5-Androsten-3β,17β-diols am Rezeptor durch eine Umwandlung in Östradiol bedingt ist, versuchten Poortman et al.[171] durch Inkubation des Δ^5-Androsten-3β,17β-diols mit Tumorgewebe zu untersuchen. Die Autoren fanden hierbei 95 % des verabreichten Hormons unverändert auf.

Da nun zahlreiche Untersuchungen die Fähigkeit des Tumorgewebes Steroide zu metabolisieren aufzeigen[1,2,105,149,150], könnte der fehlende Nachweis der Verstoffwechselung des Δ^5-Androsten-3β,17β-diols durch Tumorgewebe u.a. durch eine zu geringe Aktivität der erforderlichen Enzyme in den Proben bedingt gewesen sein.

Da bekannt ist, daß die menschliche Placenta Steroide in hohem Maße aromatisieren kann[21,77,186,187], versuchten wir anhand des placentaren Aromatisierungssystems die Frage der Aromatisierung des Δ^5-Androsten-3β,17β-diols zu Östradiol zu klären und darüberhinaus durch die Darstellung des Metabolisierungsweges des Δ^5-Androsten-3β,17β-diols in der menschlichen Placenta weitere Einsichten über die Verstoffwechselung dieses noch wenig untersuchten Hormons zu gewinnen.

II. Literaturüberblick

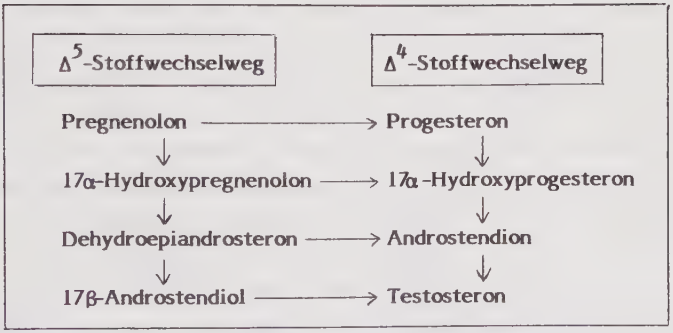
2.1. Δ^5-Androsten-3β,17β-diol (17β-Androstendiol)

17β-Androstendiol ist ein Hormon aus der Gruppe der C_{19}-Steroide und leitet sich chemisch ab von den C_{21}-Steroiden, deren Ausgangsprodukt das Steransekelett darstellt. Mit einer Doppelbindung zwischen C_5 und C_6 im B-Ring und zwei Hydroxylgruppen an Position 3 und 17 in β-Stellung gehört es zur Gruppe der Δ^5-3β-Hydroxy-Steroide, die besonders im Fetalleben und während der frühen Kindheit eine große Rolle spielen.[58,199] Der bedeutenste Vertreter dieser Gruppe im menschlichen Organismus ist das Dehydroepiandrosteron bzw. dessen Sulfat.[144,226]

2.2. 17β-Androstendiol als Zwischenprodukt im Δ^5-Stoffwechselweg bei der Synthese der C_{19}-Steroide in den endokrinen Drüsen

Die Synthese der C_{19}-Steroide in den endokrinen Drüsen, d.h. Ovarien, Testes und Nebennierenrinde, kann grundsätzlich über zwei Wege erfolgen, deren gemeinsames Ausgangsprodukt Pregnenolon darstellt (s. Schema 1):

1. Über den erstmals von Slaunwhite et al.[207] beschriebenen Δ^4-Stoffwechselweg oder
2. über den von Neher und Wettstein[156] aufgezeigten Δ^5-Stoffwechselweg.



Schema 1: Synthesewege der C_{19}-Steroide in den endokrinen Drüsen

Die Hypothese von Neher und Wettstein[156], daß grundsätzlich in allen steroidbildenden Drüsen beide Wege nebeneinander, jedoch je nach Spezies und Organ in unterschiedlichem Ausmaß vorkommen, wurde durch Untersuchungen mehrerer Autoren nachgewiesen (s. Tabelle 1).
Einige Autoren[60,79,96] konnten hierbei im Δ^5-Stoffwechselweg neben der Umwandlung des Dehydroepiandrosterons zu Androstendion eine Verstoffwechselung des Dehydroepiandrosterons über 17β-Androstendiol zu Testosteron nachweisen. Inwiefern dieser Metabolit quantitativ eine Rolle im Δ^5-Stoffwechselweg spielt, ist zur Zeit noch nicht geklärt. Die Bedeutung der von mehreren Autoren[60,79,96] aufgezeigten Umwandlung von 17α-OH-Pregnenolon zu 17α-OH-Progesteron muß ebenfalls weiter untersucht werden.

2.3. Herkunft und Vorkommen des 17β-Androstendiols im Plasma

Während H. Hirschmann und F.B. Hirschmann[90] schon 1945 das α-Epimer des Androstendiols (Δ^5-Androsten-3β,17α-diol) aus dem Urin eines Knaben mit Nebennierenrindentumor isolieren konnten, und Mason und Kepler[141] ebenfalls 1945 diesen Metaboliten nach Injektion von Dehydroepiandrosteron aus dem menschlichen Urin extrahiert hatten, gelang Fotherby[71] im Jahr 1958 erstmals die Isolierung des 17β-Epimers aus dem menschlichen Urin. Verschiedene Autoren (s. Tabelle 2) bestimmten seitdem die Konzentration dieses Hormons in freier und gebundener Form im Nebennierenvenenblut, im peripheren Plasma und in der Spermavene. Hierbei zeigte sich, daß die Konzentration des konjugierten Hormons im Plasma bedeutend höher ist als die des freien (s. Tabelle 2).
Für die im Vergleich zur Frau erheblich höheren 17β-Androstendiol-Spiegel des Mannes scheint in erster Linie die testikuläre Sekretion sowohl des freien als auch des konjugierten 17β-Androstendiols verantwortlich zu sein.[178] Laatikainen et al.[116] konnten zeigen, daß die Sekretion des freien 17β-Androstendiols aus den Testes die peripheren Plasmaspiegel weit übertrifft, während sich die sulfokonjugierten Hormone in der Spermavene und im peripheren Plasma nur geringfügig unterscheiden.[115]
Da die Konzentration des freien und des sulfokonjugierten 17β-Androstendiols im Plasma des Mannes ungefähr zweimal höher ist als die der Frau (s. Tabelle 2), vermuten Rosenfield und Otto[178], daß 17β-Androstendiol mit einem großen Pool von 17β-Androstendiolsulfat im Gleichgewicht steht.

Tab. 1: **Synthesewege der C_{19}-Steroide in den endokrinen Drüsen**

Autor	Syntheseort	Stoffwechselweg
Bongiovanni[25]	fetale Nebennierenrinde des Menschen	ausschließlich Δ^5-Stoffwechselweg
Eberlein[58]	fetale Nebennierenrinde des Menschen	ausschließlich Δ^5-Stoffwechselweg
Ahmad und Gower[3]	Rattenhoden	beide Wege, Δ^5-Stoffwechselweg geringere Bedeutung
Eik-Nes und Kekre[60]	Hundehoden	beide Wege, Δ^5-Stoffwechselweg größere Bedeutung
Hagen und Eik-Nes[79]	Hundehoden	beide Wege, Δ^5-Stoffwechselweg größere Bedeutung
Hoschoian und Brownie[96]	Affenhoden	beide Wege, Δ^5-Stoffwechselweg größere Bedeutung
Kahnt et al.[109]	Nebenieren und Hoden des Stieres	Δ^5-Stoffwechselweg im Hodengewebe von untergeordneter Bedeutung, beide Wege nachgewiesen
Neher und Wettstein[156]	Schweinenieren und Stierhoden	in beiden Geweben Δ^4- und Δ^5-Stoffwechselweg, Δ^4-Weg im Hoden größere, Δ^5-Weg in der Nebennierenrinde größere Bedeutung
Leymarie und Savard[130]	Ovarialstroma des Menschen	Δ^4- und Δ^5-Stoffwechselweg
Patwardhan und Lanthier[161]	Ovarialfollikel des Menschen	beide Wege, Δ^5-Stoffwechselweg vorherrschend
Rice und Savard[174]	Ovarialstroma des Menschen	Δ^4- und Δ^5-Stoffwechselweg
Ryan[189]	Corpus luteum in der Schwangerschaft	Δ^4-Stoffwechselweg
Ryan und Petro[190]	Follikel-Theka-Zellen des Menschen	Δ^5-Stoffwechselweg
	Follikel-Granulosa-Zellen des Menschen	Δ^4-Stoffwechselweg
Schenker et al.[194]	Postmenopause-Ovarialstroma des Menschen	Δ^5-Stoffwechselweg
Somma et al.[213]	Ovarialfollikel, Ovarialstroma und Corpus luteum des Menschen	Δ^4- und Δ^5-Stoffwechselweg, Δ^5-Stoffwechselweg im Follikel vorherrschend

Tab. 2: **17β-Androstendiol- und 17β-Androstendiolsulfatspiegel beim Menschen**

Autor	Material	Isolierte Substanz	Konzentration (ng/100ml)
Demisch et al.[44]	Plasma ♂	freies 17β-Androstendiol	117,9 ± 32,5
	♀		98,5 ± 41,5
Demisch et al.[45]	Plasma ♂	freies 17β-Androstendiol	109,9 ± 42,6
	♀		61,5 ± 22,7
Eberlein[58]	Fetalplasma	17β-Androstendiolsulfat	$5{,}0 \times 10^3$
Heyns und De Moor[89]	Plasma ♂	freies 17β-Androstendiol	125,0
	♀		99,5
Hirschmann et al.[91]	Nebennierenvenenblut	freies 17β-Androstendiol	200 - 500
Kirschner et al.[111]	Plasma ♀	freies 17β-Androstendiol	90,0 ± 20,0
Laatikainen et al.[116]	Spermavenenblut	freies 17β-Androstendiol	$18{,}5 \times 10^3$
Loriaux und Lipsett[133]	Plasma ♂	freies 17β-Androstendiol	161,0 ± 52,0
	♀		96,0 ± 46,0
Rosenfield und Otto[178]	Plasma ♂	freies 17β-Androstendiol	124,0 ± 26,4
	♀		68,2 ± 24,5
Vikho[229]	Plasma ♂	17β-Androstendiolsulfat	$28{,}7 \times 10^3 \pm 26{,}5 \times 10^3$
	♀		$11{,}3 \times 10^3 \pm 8{,}2 \times 10^3$
Wieland et al.[238]	Nebennierenvenenblut	freies 17β-Androstendiol	400 - 800

Die wesentlich niedrigeren Plasmaspiegel der Frau scheinen sich neben der Abgabe aus den Ovarien und der Nebennierenrinde aus dem peripheren Metabolismus des Dehydroepiandrosterons zusammenzusetzen.[111] Laut Kirschner et al.[111] leitet sich etwa ein Drittel des 17β-Androstendiols im Plasma vom Dehydroepiandrosteron ab.

2.4. Bedeutung des 17β-Androstendiols im menschlichen Stoffwechsel

Die von Baulieu und Robel[13] gezeigte Umwandlung von 17β-Androstendiol zu Testosteron in vivo scheint im menschlichen Körper nur in sehr geringem Umfang abzulaufen. Kirschner et al.[111] konnten zeigen, daß nur 1-2% des 17β-Androstendiols in Testosteron umgewandelt werden, das entspricht etwa 1-4% der totalen Testosteronproduktion im Plasma.

Während die 17β-Androstendiolkonzentration des Mannes nur ungefähr 20% der Testosteronkonzentration ausmacht[178], ist die 17β-Androstendiolkonzentration der Frau fast doppelt so hoch wie die Testosteronkonzentration.[178]

Da nun die androgene Wirkung des 17β-Androstendiols zwischen der des Dehydroepiandrosterons und der des Testosterons einzuordnen ist[54,56], ist zumindest bei der Frau mit androgenen Wirkungen zu rechnen, die auf das 17β-Androstendiol zurückzuführen sind.

So konnten Hay und Hodgins[81] nach Inkubation von Achselfettgewebe einer jungen Frau, das viele Terminalhaare und Talgdrüsen, die als sog. 'target tissues' der Androgene aufgefaßt werden[81], enthielt, eine hohe Umwandlungsrate von Dehydroepiandrosteron bzw. dessen Sulfat zu 17β-Androstendiol nachweisen. Auch in den Bartfollikeln hirsuter Frauen[62] findet eine im Vergleich zu normalem Hautgewebe[39] deutlich höhere Umwandlung von Dehydroepiandrosteron zu 17β-Androstendiol statt.

Kirschner et al.[111] fanden im Plasma hirsuter Frauen deutlich erhöhte Werte für Dehydroepiandrosteron sowie erhöhte Produktionsraten für 17β-Androstendiol, die sich jedoch wegen der ebenfalls erhöhten Metabolisierungsraten nicht in einer Erhöhung des 17β-Androstendiolspiegels ausdrückten.

2.4.1. Bedeutung des 17β-Androstendiols als Prekursor der Östrogene in der Schwangerschaft

Während der Schwangerschaft finden beträchtliche hormonelle Veränderungen

im Körper der Frau statt. Am eindruckvollsten sind zweifellos die gegen Ende der Schwangerschaft 100-1000fach höheren Ausscheidungsraten für Pregnandiol, einem Abbauprodukt des Progesterons[228], und die der Östrogene, wobei Östriol mit zunehmender Schwangerschaftsdauer eine quantitativ immer bedeutendere Rolle einnimmt.[51]

Schon 1905 führte Halban[80] die sehr hohen Östrogenmengen auf das für die Schwangerschaft spezifische Organ, die Placenta, zurück, und nicht auf eine veränderte Funktion der mütterlichen hormonproduzierenden Drüsen. Noch 1960 wurde diese Ansicht von Diczfalusy[47] unterstützt, der die Östrogensynthese in den synzizialen Elementen der Placenta vermutete. Diese These beruhte u. a. auf der von Ryan[187] nachgewiesenen quantitativ bedeutenden Aromatisierung der Androgene durch die menschliche Placenta. Doch die Rolle der Placenta als alleinigem Produzenten der sehr hohen während des Schwangerschaftsverlaufes gemessenen Östrogenmengen, wurde durch die Versuche von Levitz et al.[129], die im wesentlichen durch andere Autoren[126,220,221,241] bestätigt werden konnten, infrage gestellt.

Levitz et al.[127], die zunächst eine Umwandlung von Acetat zu Östron und Östradiol nachgewiesen hatten, konnten in neueren Untersuchungen[129] aufzeigen, daß die Placenta im Gegensatz zu anderen hormonbildenden Drüsen nicht in der Lage ist, Cholesterin bzw. den Steroidkern de novo in ausreichenden Mengen zur Verfügung zu stellen.

Da in früheren Untersuchungen die mütterlichen Ovarien[48] ebenso wie die mütterliche Nebennierenrinde als Östrogenproduzenten während der Schwangerschaft ausgeschlossen worden waren[50], wurde in der Folgezeit die Beteiligung des Feten an der Hormonsynthese immer wahrscheinlicher. Schon Lelong et al.[125] hatten 1951 die Theorie der Östrogenbildung in der fetalen Nebennierenrinde vertreten, da die Östrogenkonzentration dieses Organs das 1,5-2fache der Placenta betrug. Zudem war bekannt, daß die Nebennierenrinde beim Menschen und anderen Primaten während des Fetallebens eine zunehmende Vergrößerung erfährt, die nach Untersuchungen von Rotter[181] und Lanman[118] auf die sog. fetale Zone zurückzuführen ist, die sich nach der Geburt parallel mit dem Abfall der Östrogene im kindlichen Urin verkleinert. Aufgrund der Vermutung, daß die Nebennierenrinde bei anencephalen Feten nach anfänglich normaler Entwicklung zwischen dem 5. und 7. Schwangerschaftsmonat eine Degeneration aufweist[157], untersuchten Frandsen und Stakeman[72]

zur Abklärung der Bedeutung der fetalen Nebennierenrinde im Östrogenstoffwechsel der Schwangeren Schwangerschaften mit anencephalen Feten. Hierbei fanden die Autoren eine deutlich verminderte Östrogenausscheidung im Urin der Schwangeren. Diese Untersuchungen konnten in der Folgezeit von einigen Autoren bestätigt werden.[42,188,202]

Im Jahre 1963 zeigten dann Frandsen und Stakeman[73], daß die während der Schwangerschaft stattfindende Östrogensynthese neben einer normalen Funktion der Placenta eine intakte fetale Nebennierenrinde voraussetzt. Die Autoren stellten die These auf, daß die fetale Nebennierenrinde sog. Prekursoren abgibt, die dann in der Placenta zu Östrogenen umgewandelt werden. Jedoch schien dieser Ablauf der Östrogensynthese nicht für die Gesamtheit der während der Schwangerschaft produzierten Östrogene zuzutreffen, denn Cassmer[38] konnte zeigen, daß der nach Abnabelung abrupt stattfindende Abfall der Östrogene im Urin bei Frauen in der 12.-18. Schwangerschaftswoche durch Perfusion der Placenta mit mütterlichem Blut verhindert werden konnte. In Anlehnung an die von Frandsen und Stakeman[73] geforderten fetalen Prekursoren wurde nun das Vorliegen mütterlicher Prekursoren untersucht.

Angesichts der Tatsache, daß die Placenta die geeigneten Enzymsysteme besitzt, um die Δ^5-3β-Hydroxy-Steroide in die entsprechenden Δ^4-3-Ketosteroide umzuwandeln[14,19,163,192], die dann weiter zu Östrogenen aromatisiert werden[77,82,142,187], untersuchten Baulieu und Dray[12] sowie Siiteri und MacDonald[202] die Bedeutung des quantitativ wichtigsten, hauptsächlich in Sulfatform vorliegenden[11,158,227] und während der Schwangerschaft in erster Linie für den Abfall der 17-Ketosteroide[74] im menschlichen Plasma verantwortlichen Dehydroepiandrosterons. Die Ergebnisse der Autoren zeigten eine im Vergleich zu Nichtschwangeren signifikante Umwandlung des Dehydroepiandrosteronsulfats, des Androstendions und des Testosterons zu Östrogenen, jedoch maßen sie angesichts der limitierten Menge des Dehydroepiandrosteronsulfats im mütterlichen Kreislauf und der sehr hohen Östrogenproduktion während der Schwangerschaft diesem Syntheseweg höchstens während der Frühschwangerschaft, bei Schwangerschaften mit anencephalen Feten und Blasenmolen eine gewisse Bedeutung bei.

Schon 1955 hatte Migeon et al.[145] Messungen von konjugiertem Dehydroepiandrosteron im mütterlichen und fetalen Blute vorgenommen und hierbei

höhere Werte im Fetalblut gefunden. Diese Ergebnisse konnten von Colás et al.[41] bestätigt werden. Eberlein[58] konnte zeigen, daß das fetale Blut zahlreiche Steroide enthält, die infolge eines schon von anderen Autoren[25,212] nachgewiesenen Mangels der fetalen Nebennierenrinde an 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase- Δ^5- Δ^4-Isomerase in der Mehrzahl eine Δ^5-3β-Hydroxy-Konfiguration aufweisen, wobei Dehydroepiandrosteron das quantitativ bedeutendste Steroid ist.

Bolté et al.[21] gelang es mittels Perfusionsstudien zu zeigen, daß die von der fetalen Seite der Placenta angebotenen Androgene Dehydroepiandrosteronsulfat, Dehydroepiandrosteron, Testosteron und Androstendion in hohem Maße zu Östron und Östradiol verstoffwechselt werden. Angesichts der hohen, im fetalen Blut gemessenen Werte an Dehydroepiandrosteronsulfat [41,145], der signifikanten arteriovenösen Differenz der Hormonkonzentrationen[205] und der in der Placenta beschriebenen Sulfatasen[172,233] war nun gezeigt worden, daß das von der fetalen Nebennierenrinde abgegebene Dehydroepiandrosteronsulfat der bedeutendste Prekursor der während der Schwangerschaft gebildeten Hormone Östron und Östradiol ist, zumal anderen Synthesewegen offensichtlich keine große Bedeutung zukommt: da die fetalen Gewebe aufgrund des oben beschriebenen Mangels an 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase- Δ^5- Δ^4-Isomerase nicht in der Lage sind, Δ^5-3β-Hydroxy-Steroide in Δ^4-3-Ketosteroide umzuwandeln[24,137,138], kann die von einigen Autoren[107,137,138,209] nachgewiesene Fähigkeit fetaler Gewebe, und hier insbesondere der Leber, Δ^4-Androgene in Östrogene umzuwandeln, keine große Rolle spielen. Eine Umwandlung des in großer Menge in der Placenta vorhandenen Progesterons in Östrogene scheint ebenso unbedeutend zu sein[100,107, 108,166,202,211,230] wie die beschriebene Östrogensynthese aus Progesteron, 17α-OH-Pregnenolon und Dehydroepiandrosteron[107,209] in der fetalen Leber. War die Entstehung der Östrogene Östron und Östradiol durch diesen Syntheseweg aufgezeigt, so schien für das vor allem gegen Ende der Schwangerschaft quantitativ immer bedeutender werdende Östrogen Östriol [51,90] ein anderer Syntheseweg zuzutreffen: während Östriol bei gesunden, nichtschwangeren Frauen durch den peripheren Metabolismus des Östrons und in geringerem Maße des Östradiols entsteht[64,65], ließen die nach Verabreichung von markiertem Östradiol an Schwangere im Urin gemessenen im Gegensatz zu Östron und Östradiol deutlich erniedrigten Östriolratios auf eine andere Herkunft

des Östriols schließen.[66,78]

Eine Umwandlung von Östron und Östradiol zu Östriol durch die menschliche Placenta war schon 1953 durch Untersuchungen von Ryan und Engel[184] ausgeschlossen worden. Trotz einiger gegenteiliger Ergebnisse[108,210,224] konnten diese Untersuchungen bestätigt werden[6,21,128], wobei einige Autoren gleichzeitig die Unfähigkeit der menschlichen Placenta, Androgene an Position 16 zu hydroxylieren, aufzeigten.[21,43,99]

Schon 1963 war von Siiteri und MacDonald[202] und von Baulieu und Dray[12], die nach Injektion von Dehydroepiandrosteronsulfat an Schwangeren eine im Vergleich zu Östron und Östradiol deutlich höhere Östriolratio erhalten hatten, die Beteiligung eines 16-hydroxylierten Zwischenproduktes an der placentaren Östriolsynthese vermutet worden. Sie stützten sich dabei auf die schon 1959 von Ryan[185] gezeigte Fähigkeit der menschlichen Placenta, das 16-hydroxylierte Δ^5-Steroid Δ^5-Androsten-3β-16α-17β-triol (Androstentriol) in Östriol umzuwandeln, die, wie Ryan[188] wenig später nachwies, auch für 16α-OH-Androstendion und 16α-OH-Testosteron zutrifft. Zusätzlich war es Siiteri und MacDonald[202] gelungen, nach Verabreichung von Dehydroepiandrosteronsulfat an Schwangeren aus deren Urin Androstentriol zu isolieren. Da Schneider und Mason[198] eine Umwandlung von Dehydroepiandrosteron zu Androstentriol an Leberschnitten von Kaninchen gezeigt hatten und Fotherby et al.[70] 1957 bei einer wegen eines Mammacarcinoms adrenalektomierten und ovariektomierten Frau die Umwandlung von Dehydroepiandrosteron zu 16α-OH-Dehydroepiandrosteron nachweisen konnten, hielten Siiteri und MacDonald[202] die 16-Hydroxylierung mütterlichen Dehydroepiandrosteronsulfats in der Leber oder Nebennierenrinde mit anschließender Aromatisierung durch die Placenta zu Östriol für einen geeigneten Syntheseweg. Angesichts der limitierten Dehydroepiandrosteronsulfatmengen im mütterlichen Kreislauf (vgl. Östron- und Östradiolsynthese) forderten die Autoren einen entsprechenden Mechanismus im fetalen Kreislauf.

Bolté et al.[23] konnten dann 1964 zeigen, daß das in den fetalen Kreislauf injizierte Dehydroepiandrosteronsulfat in einem vom Metabolismus des Östrons und Östradiols unabhängigen Weg zu Östriol synthetisiert wird. Der von ihnen geforderte fetale Prekursor 16α-OH-Dehydroepiandrosteronsulfat wurde kurz danach von Colás et al.[41] erstmals isoliert. Die auch von anderen Autoren[57] gemessenen hohen Raten dieses Metaboliten sowie die von Magen-

dantz und Ryan[136] dargestellte gute Aromatisierbarkeit dieses Metaboliten durch die Placenta zeigen die überragende Bedeutung des 16α-OH-Dehydroepiandrosterons als Prekursor des in der Schwangerschaft gebildeten Östriols. Die Bedeutung des von Bolté et al.[22] vermuteten Syntheseweges der Überleitung placentaren Östrons in den fetalen Kreislauf mit dortiger Sulfatierung und 16α-Hydroxylierung und anschließender Aromatisierung in der Placenta zu Östriol kann noch nicht abschließend beurteilt werden, da widersprüchliche Messungen über den Östrogengehalt der Nabelschnurgefäße vorliegen: während Roy[182], der Östron, Östradiol und Östriol bestimmte, keine arteriovenösen Differenzen messen konnte, geben Maner et al.[139] eine signifikante Erhöhung des Östron- und Östradiolgehaltes der Nabelvene gegenüber der Nabelarterie bei gleichem Östriolgehalt an. Klausner und Ryan[112], die lediglich die Östriolkonzentration gemessen haben, fanden keine Konzentrationsunterschiede. Ebenso liegen über eine 16α-Hydroxylierung placentaren Östradiols in der fetalen Nebennierenrinde unterschiedliche Ergebnisse vor: während Engel et al.[61] sowie Diczfalusy et al.[49] eine Umwandlung des Östradiols in Östriol zeigten, konnte dies von Haynes et al.[83] nicht bestätigt werden.

Inwiefern der Metabolit 17β-Androstendiol eine Bedeutung innerhalb der zu Östron und Östradiol bzw. Östriol führenden Synthesewege haben könnte, soll im folgenden dargestellt werden.

Aufgrund des erstmals von Bongiovanni[25] beschriebenen Mangels der fetalen Nebennierenrinde an 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase-Δ^5-Δ^4-Isomerase findet die Hormonsynthese ausschließlich über den sog. Δ^5-Stoffwechselweg statt. Die innerhalb dieses Weges beschriebene Umwandlung von Dehydroepiandrosteron zu 17β-Androstendiol (s. 2.2.) könnte nun, da eine Umwandlung von Dehydroepiandrosteron zu Androstendion nicht stattfinden kann, deutlich verstärkt werden, was eine vermehrte Abgabe von 17β-Androstendiol bzw. dessen Sulfat aus der fetalen Nebennierenrinde zur Folge hätte. Dieser Effekt könnte durch eine von Bolté et al.[24] beschriebene Umwandlung des Dehydroepiandrosteronsulfats zu 17β-Androstendiolsulfat in der fetalen Leber verstärkt werden.

Messungen des 17β-Androstendiolsulfats in den Nabelschnurgefäßen wurden erstmals von Eberlein[58] vorgenommen, der Werte von 5 µg/100 ml angab. Die von Shackleton et al.[200] gemessenen deutlich höheren Werte (arteriell 126 µg/100 ml, venös 94 µg/100 ml) wurden von den Autoren mit einem

großen, darin enthaltenen Anteil des 17α-Epimers erklärt. Sowohl im kindlichen Urin, aus dem bis zur Rückbildung der fetalen Nebennierenrindenvergrößerung große Mengen an Δ^5-3β-Hydroxysteroiden isoliert werden konnten, als auch im fetalen Blut bestimmten Shackleton et al.[200] das Verhältnis des 17α- zu 17β-Androstendiols mit 9 : 1. Im Gegensatz hierzu fanden die Autoren ein deutliches Überwiegen des 17β-Androstendiols im Urin Erwachsener. Diese Ergebnisse veranlaßten Shackleton et al.[200] die These aufzustellen, daß während des Fetallebens beide Epimere produziert werden, daß das 17β-Epimer jedoch aufgrund einer bevorzugten 16α-Hydroxylierung in der fetalen Leber in deutlich niedrigerer Konzentration isoliert werden kann. Manson et al.[140] konnten dann durch den Nachweis einer selektiven 16α-Hydroxylierung des 17β-Androstendiols in der fetalen Leber diese These unterstützen.

Ob eine zusätzliche Aromatisierung des 17β-Androstendiols zu Östradiol in der Placenta ebenfalls zu den erniedrigten 17β-Androstendiolspiegeln beiträgt, wird von Shackleton et al.[200] offengehalten.

Die quantitative Bedeutung der auch von Bolté et al.[24] in der fetalen Leber gezeigten 16α-Hydroxylierung des 17β-Androstendiols zu Androstentriol mit konsekutiver Aromatisierung dieses Produktes in der Placenta[185] kann im Vergleich zu den von Magendantz und Ryan[136] über 16α-OH-Dehydroepiandrosteron → 16α-OH-Androstendion → 16α-OH-Östron bzw. 16α-OH-Dehydroepiandrosteron → Androstentriol → 16α-OH-Testosteron beschriebenen alternativ verlaufenden Östriolsynthesewegen zur Zeit noch nicht beurteilt werden.

2.5. Aromatisierung der Androgene

B. Zondek [243] stellte vor über 40 Jahren die Hypothese auf, daß Östrogene aus Androgenen entstehen können. Mehrere Autoren[37,52,95,155,215,216] konnten in den nachfolgenden Jahren nach Verabreichung bestimmter Androgene an geschlechtsreife und kastrierte Männer und Frauen sowie an verschiedene Tierspezies eine Zunahme der östrogenen Aktivität im Urin beobachten. Da aber völlig unphysiologische Dosen verwendet werden mußten, ließ sich eine Stimulierung der körpereigenen Östrogenproduktion nie ganz ausschließen.

Erst unter Verwendung radioaktiver Substanzen gelang es Heard et al.[87] 1955, die direkte Umwandlung nachzuweisen: nach Injektion von markiertem

Testosteron bei einer trächtigen Stute konnte er 1 % der verabreichten Radioaktivität als Östron im Urin wiederfinden. Ebenso konnten Baggett und Engel[9] und Wotiz et al.[240] nach Inkubation von menschlichem Ovarialgewebe mit ^{14}C-Testosteron, Östron, Östradiol und Östriol isolieren. Braun-Cantilo et al.[29] beschrieben 1962 nach Injektion von ^{14}C-Testosteron die Isolierung und Identifizierung von Östron, Östradiol und Östriol bei zwei Frauen mit Mammacarcinom.

In den folgenden Jahren rückte die Frage nach dem chemischen Ablauf und nach den Syntheseorten dieser sog. Aromatisierung in den Vordergrund des Interesses.

2.5.1. Chemischer Ablauf der Aromatisierungsreaktion

Folgende Bedingungen mußten für die Umwandlung eines Androgens in ein Östrogen gefordert werden:

1. C_{19}-Struktur
2. Entfernung der Methylgruppe an Position 10 des Steroidgerüstes
3. Einführung zweier Doppelbindungen in Ring A

1955 isolierte Meyer[143] 19-OH-Androstendion aus der Nebennierenrinde von Kühen. Da die Möglichkeit der erleichterten Elimination der angulären Methylgruppe durch Einführen einer OH-Gruppe bekannt war[59], schien dieser Metabolit ein ideales Ausgangsprodukt für die Aromatisierungsreaktion zu sein, was anschließend verschiedene Untersuchungen[7,31,77,82,131,142,152,187,239] bestätigen konnten. Akhtar und Skinner[4] gelang darüberhinaus die Darstellung eines weiteren Hydroxylierungsproduktes, des 19-Oxo-Androstendions, das schon von Hayano et al.[82], Morato et al.[152] sowie Axelrod und Goldzieher[7] als Intermediärprodukt der Reaktion gefordert worden war, so daß sich die Reaktionsfolge gemäß Abb. 1 darstellt.

Hatte Ryan[187] als Voraussetzung für den erfolgreichen Ablauf der Reaktion die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und NADPH bzw. eines NADPH-regenerierenden Systems gefordert, so konnten nun Ahktar und Skinner[4] sowie Morato et al.[152] die Abhängigkeit der einzelnen Teilschritte von diesen Komponenten beweisen (s. Abb.1). Thompson und Siiteri[222] ergänzten diese Ergebnisse durch ihre Feststellung, daß die Umwandlung von 1 Mol Androgen zu 1 Mol Östrogen 3 Mol O_2 sowie 3 Mol NADPH erfordert.

Über den genauen Mechanismus der Abspaltung der Methylgruppe an C_{10}

und der damit verbundenen Einführung zweier Doppelbindungen in Ring A bestehen zur Zeit noch verschiedene Ansichten.

Breuer und Grill[31] zeigten 1961 die Abspaltung der Methylgruppe als Formaldehyd, andere Autoren[206] isolierten Ameisensäure, während Axelrod et al.[8] sowohl Formaldehyd als auch Ameisensäure nachweisen konnten.

Die Ansicht, die u. a. von Dorfman et al.[55] geäußert wurde, daß Formaldehyd nach Aromatisierung von 19-OH-Androstendion und Ameisensäure nach Aromatisierung von 19-Oxo-Androstendion anfallen würden, schien insofern nicht haltbar, da verschiedene Autoren[7,82,152] 19-Oxo-Androstendion als obligate Zwischenform der Aromatisierungsreaktion forderten. Ein weiteres Hydroxylierungsprodukt wurde von einigen Autoren[4,229] nicht ausgeschlossen, da bei der Umwandlung des 19-Oxo-Androstendions zu Östron, wie Morato et al.[152] sowie Hayano et al.[82] gezeigt hatten, NADPH und Sauerstoff erforderlich sind.

Doch konnte nachgewiesen werden, daß eine weitere Oxydation zur Carboxygruppe nicht sehr wahrscheinlich ist, da Inkubationen mit Plazentarmikrosomen ergaben, daß das resultierende Produkt 19-Nor-Androstendion nur in sehr geringem Umfang zu Östron aromatisiert wird.[77,152,187] Wenig wahrscheinlich ist eine vor allem an Mikroorganismen studierte $C_{1,2}$-Dehydrierung, gefolgt von einer spontanen Abgabe der C_{19}-Gruppe: diese Reaktion benötigt keine Cofaktoren[153,219], Δ^1-Dehydrogenasen wurden bisher in tierischen Geweben nicht nachgewiesen[219] und im Gegensatz zu der von mehreren Autoren[153,219,223] bewiesenen Entfernung des 1β-Atoms wird bei dieser Reaktion das 1α-Atom entfernt.[68,153,219]

Während verschiedene Autoren[32,153,223] die Entfernung des 2β-Atoms[67,68] durch Bildung einer Enolform, d. h. Übergang des 2β-Atoms an Position 3, annehmen, ist der chemische Vorgang, der zur Elimination des 1β-Atoms führt, noch weitgehend ungeklärt.

Nach Morato et al.[153] wird das 1β-Atom erst nach der Oxydation der C_{19}-Methylgruppe zur Hydroxy- bzw. Oxokomponente und kurz vor bzw. gleichzeitig mit dieser Gruppe entfernt, da Androst-1,4-dien-3,17-dion, 19-nor-androst-4-en-3,17-dion und 19-nor-androst-5-(10)-en-3,17-dion nur in geringem Ausmaß aromatisiert werden, wie schon andere Autoren[74,142,152,187] nachgewiesen haben. Der Verlust des 1β-Atoms, der durch Bildung der Enolform erleichtert wird, könnte in Form eines Hydridions gemeinsam mit der oxy-

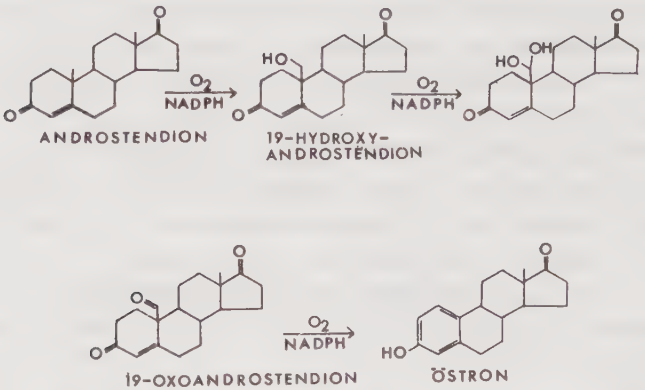


Abb. 1: **Aromatisierungsreaktion dargestellt an der Umwandlung von Androstendion zu Östron**

dierten C_{10}-Gruppe oder nach Ersatz des H-Atoms durch eine OH-Gruppe als Hydroxy-Ion vor sich gehen.[153] Townsley und Brodie[223], die letztere Möglichkeit prüften, konnten nur eine minimale Aromatisierung der an Position 1 hydroxylierten Substrate nachweisen, jedoch muß eingewendet werden, daß die Autoren 19-Nor-Androstendion verwendet haben.

Angesichts der Tatsache, daß bei Ablauf der Aromatisierungsreaktion eine dritte Hydroxylierung stattfindet[4,222], die C_{19}-Gruppe jedoch lediglich zum Aldehyd oxydiert wird, untersuchten Hosoda et al.[97] die Aromatisierungsfähigkeit des an Position 2 hydroxylierten Androstendionaldehyds. Die Autoren fanden hierbei im Gegensatz zu Gual et al.[77], der jedoch nur mit 2β-OH-Androstendion gearbeitet hatte, eine ausgezeichnete Umwandlung des 2β-OH-C_{19}-Aldehyds zu Östron und stellten die These auf, daß die 2β-Hydroxylierung des Δ^4-3-Keto-C_{19}-Aldehyds die letzte enzymatische Reaktion in der Östrogensynthese darstellt, die durch die nichtenzymatische Aromatisierung beendet wird.

2.5.2. Orte der Östrogensynthese

Östrogensynthetisierende Organe sind laut Dorfman[53] Ovar, Testes, Nebennierenrinde und Placenta. In diesen Organen werden die Östrogene über androgene Vorstufen gebildet (s. 2.5.1.). Aber nicht nur in diesen Organen findet die Aromatisierung statt: West et al.[237] konnten 1955 erstmals bei adrenalektomierten und ovariektomierten Frauen eine Umwandlung von Androgenen zu Östrogenen nachweisen.

In welchem Organ diese sog. extraglanduläre Östrogensynthese stattfinden soll, ist bis heute noch nicht geklärt. Grundsätzlich scheint jede Zelle des menschlichen und tierischen Organismus in unterschiedlichem Maße die Fähigkeit zu besitzen, Androgene in Östrogene umzuwandeln, wie Tab. 3 zeigt.

III. Eigene Untersuchungen

3.1. Grundzüge der Untersuchungen

Die vorliegende Arbeit beschreibt den Stoffwechsel des 17β-Androstendiols (Δ^5-Androsten-3ß,17ß-diol) im menschlichen Placentahomogenat unter besonderer Berücksichtigung der Verstoffwechselung dieses Hormons zu Östradiol.

Insgesamt wurden anhand von 12 Placenten 16 Versuche durchgeführt. Bei 10 Versuchen (Placenta 2-11) wurde die sog. Methode mit internem Standard angewendet (s. 3.3.), weitere 6 Versuche (Placenta 1 und Placenta 7-11) wurden nach der von Siiteri et al.[204] entwickelten sog. Doppelisotopenmethode (s. 3.3.) durchgeführt.

Der erste Versuch diente der Darstellung einer eventuell vorhandenen direkten Aromatisierung des 17β-Androstendiols zu Östradiol. Die weiteren Untersuchungen sollten Aufschluß über die Verstoffwechselung des 17β-Androstendiols in der menschlichen Placenta erbringen.

3.2. Material

3.2.1. Lösungsmittel und Pufferlösung

Alle Lösungsmittel waren von analytischer Qualität und wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen. Die Phosphatpufferlösung wurde selbst hergestellt und mit einem geeichten ph-Meter überprüft. 9,596 g Na_2HPO_4

Tab. 3: **Orte der extraglandulären Östrogensynthese**

Autor	Syntheseort	Reaktion
Flores et al.[69]	Diencephalon des Rhesusaffen	Androstendion zu Östron
		Testosteron zu Östradiol
Jungmann et al.[107]	Fetales Lebergewebe	Androstendion zu Östron, Östradiol und Östriol
		Testosteron zu Östron, Östradiol und Östriol
Mancuso et al.[138]	Fetales Lebergewebe	Androstendion zu Östron, Östradiol und Östriol
		Testosteron zu Östron, Östradiol und Östriol
Naftolin et al.[154]	Diencephalon von männlichen Feten	Androstendion zu Östron und Östradiol
Nimrod und Ryan[159]	Menschliches Fettgewebe	Androstendion zu Östron und Östradiol
		Testosteron zu Östron und Östradiol
Ryan et al.[191]	Limbisches System und Hypothalamus verschiedener Tierspezies	Androstendion zu Östron
	Limbisches System und Hypothalamus des menschlichen Feten	Androstendion zu Östron und Östradiol
Schindler et al.[196]	Menschliches Fettgewebe	Androstendion zu Östron und Östradiol
Schindler[197]	Verschiedene fetale Gewebe	Androstendion zu Östron
Slaunwhite et al.[209]	Fetales Lebergewebe	Testosteron zu Östradiol und Östriol
Vittek et al.[231]	Kieferknochen der Ratte	Testosteron zu Östradiol und Östriol

(Merck 6580) und 1,743 g KH_2PO_4 (Merck 4873) wurden auf einer Mikrowaage abgewogen und in 1000 ml Aqua bidest gelöst. Die Pufferlösung war einmolar und hatte ein ph von 7,4.

3.2.2. Kristalline Steroide

Die kristallinen Steroide wurden, in Methanol gelöst, als Standard bei der Dünnschichtchromatographie verwendet und als Acetate bei der Kristallisation. Folgende Steroide wurden von der Firma Steraloids, Inc., Pawling, N. Y., bezogen:

Δ^4-Androsten-3,17-dion	Androstendion
Δ^4-Androsten-17β-ol-3-on	Testosteron
1,3,5(10)-Estratrien-3-ol-17-on	Östron
1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol	Östradiol

3.2.3. Radioaktive Steroide

Die radioaktiven Steroide wurden zur Berechnung der Umwandlungsraten und zur Bestimmung der Wiederauffindungsraten verwendet. Die Reinigung der Steroide erfolgte durch eine von Siiteri et al.[204] sowie Schindler[195] beschriebene Gradientenelutionssäulenchromatographie. Anschließend wurden die Steroide in Methanol gelöst. Folgende radioaktive Steroide kamen zur Anwendung:

Östron-4-^{14}C		Code CFA 321
	spezifische Aktivität	58 mCi/mmol
Östradiol-4-^{14}C		Code CFA 320
	spezifische Aktivität	56 mCi/mmol
Testosteron-4-^{14}C		Code CFA 129
	spezifische Aktivität	53,3 mCi/mmol
Androstendion-4-^{14}C		Code CFA 248
	spezifische Aktivität	60 mCi/mmol
Androst-5-en-3β,17β-diol,7-^{3}H		Code NET 475
	spezifische Aktivität	10-25 Ci/mmol

Die radioaktiven Steroide stammten bis auf Androst-5-en-3β,17β-diol,7-^{3}H aus dem Radiochemical Centre Amersham, Androst-5-en-3β,17β-diol,7-^{3}H wurde von der Firma New England Nuclear bezogen.

3.2.4. Untersuchte Gewebe

Für die Inkubation wurde nur frisches Placentargewebe verwendet, das sofort im Anschluß an die Geburt homogenisiert, zentrifugiert und inkubiert wurde. Folgende Placenten (P) wurden für die Versuche verwendet:

P 1) F. B., JN 346/76
geb. 10.08.1951, I. Para, 41. SSW
Spontangeburt aus II. HHL
Kind: ♂ , 2910 g, 49 cm, Apgar 4
Geburtsdauer: 5 h 9 min
Placentagewicht: 500 g

P 2) F. E., JN 632/76
geb. 03.11.1956, I. Para, 42. SSW
Spontangeburt aus II. HHL
Kind: ♀ , 3300 g, 52 cm, Apgar 9
Geburtsdauer: nicht angegeben
Placentagewicht: 610 g

P 3) P. R., JN 666/76
geb. 08.10.1951, 42. SSW
Spontangeburt aus I. HHL
Kind: ♂ , 2620 g, 48 cm, Apgar 9
Geburtsdauer: 7 h 57 min
Placentagewicht: 480 g

P 4) A. Ch., JN 701/76
geb. 10.12.1946, III. Para, 41. SSW
Spontangeburt aus II. HHL
Kind: ♂ , 3980 g, 51 cm, Apgar 9
Geburtsdauer: nicht angegeben
Placentagewicht: 630 g

P 5) E. A., JN 705/76
geb. 01.05.1946, IV. Para, 40. SSW
Spontangeburt aus II. HHL
Kind: ♂, 3270 g, 47 cm, Apgar 4
Geburtsdauer: 4 h 6 min
Placentagewicht: 650 g

P 6) Z. S., JN 754/76
geb. 14.01.1952, II. Para, SSW nicht angegeben
Spontangeburt aus II. HHL
Kind: ♂, 3260 g, 51 cm, Apgar 9
Geburtsdauer: 3 h 52 min
Placentagewicht: 620 g

P 7) S. E., JN 817/76
geb. 24.06.1954, I. Para, 40. SSW
Spontangeburt aus I. HHL
Kind: ♀, 3270 g, 50 cm, Apgar 10
Geburtsdauer: 10 h 42 min
Placentagewicht: 490 g

P 8) M. J., JN 833/76
geb. 24.05.1950, II. Para, 41. SSW
Spontangeburt aus II. HHL
Kind: ♂, 3550 g, 52 cm, Apgar 9
Geburtsdauer: 4 h 12 min
Placentagewicht: 540 g

P 9) R. U., JN 852/76
geb. 26.11.1949, II. Para, 41. SSW
Spontangeburt aus II. HHL
Kind: ♂, 3370 g, 51 cm, Apgar 9
Geburtsdauer: 9 h 26 min
Placentagewicht: 450 g

P 10) R. M., JN 874/76
geb. 15.12.1946, II. Para, 39. SSW
Sectio bei I. HHL
Kind: ♂, 3780 g, 52 cm, Apgar 4
Placentagewicht: 780 g

P 11) L. I., JN 887/76
geb. 01.08.1951, I. Para, 40. SSW
Vakuumextraktion bei I. HHL und tiefem Querstand
Kind: ♀, 3380 g, 50 cm, Apgar 9
Geburtsdauer: nicht angegeben
Placentagewicht: 700 g

3.3. Methode

3.3.1. Vorbereitung der Versuche

Für jeden Versuch wurde eine Reihe von Ansätzen hergestellt. Bei den Versuchen, die mit der Doppelisotopenmethode durchgeführt wurden, wurden ca. 22,6 Mio dpm (desintegrations per minute) 17β-Androstendiol (Androst-5-en-3β,17β-diol,7^{3}H), was je nach Aktivität der gerade verwendeten gelösten Substanz 4,2 - 4,8 ml entsprach, und ca. 500 000 dpm Östradiol (Östradiol-4-^{14}C) entsprechend ca. 0,5 ml in einen 100 ml Erlenmeyerkolben pipettiert. Anschließend wurde der Inhalt des Kolbens unter Stickstoffventilation eingetrocknet. Danach wurden in den trockenen Kolben 10 ml Äthylacetat dazugegeben und nach kräftigem Durchschütteln 1/100 entsprechend 0,1 ml entnommen, in ein Niederdruckpolyäthylengläschen (NEN platic LSC vial Ne F-938) gegeben, unter Stickstoffventilation eingetrocknet und bis zur Messung bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt.

Das Verhältnis der beiden darin enthaltenen Hormone 17β-Androstendiol und Östradiol, die sog. Ratio, diente bei der Doppelisotopenmethode als Ausgangsverhältnis zur Bestimmung der Umwandlungsraten.

Die im Kolben verbliebenen 9,9 ml wurden wieder unter Stickstoffventilation eingetrocknet und bis zum Beginn des Versuchs im Kühlschrank gelagert. Bei den Versuchen mit der Methode mit internem Standard wurden ebenfalls 22,6 Mio 17 ß-Androstendiol in einen Erlenmeyerkolben pipettiert, jedoch wurde kein Östradiol zugegeben. Das weitere Vorgehen entsprach dem oben geschilderten. Das entnommene 1/100 diente hier bei der Berechnung der Wiederauffindungsrate als Ausgangsradioaktivität.

3.3.2. Inkubation

Aus der kurz zuvor geborenen Placenta wurden aus mehreren Stellen Gewebsstückchen entnommen. Für jeden Ansatz wurde 1 g Gewebe abgewogen und sofort nach Zugabe von gekühltem Phosphatpuffer zum Schutz vor Überwärmung bei ca. 3000 U/min ca. 1 Minute lang homogenisiert. Danach wurde zu dem Homogenat so viel Phophatpuffer gegeben, daß auf 1 g Placentagewebe 10 ml Pufferlösung entfielen. Um eine gleichmäßige Verteilung der Enzymaktivitäten zu erreichen, wurde das Homogenat bei 2000 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Der gebildete Überstand wurde abpipettiert und in ein Glasgefäß gegeben. Nach gutem Durchschütteln wurden in jeden

der vorbereiteten Erlenmeyerkolben 10 ml der zentrifugierten Fraktion gegeben und sofort mit der Inkubation bei 37° C im Schüttelwasserbad unter Luftzufuhr begonnen. Die Inkubation wurde nach Ablauf der für die jeweiligen Ansätze eines Versuches bestimmten Inkubationszeiten durch Zugabe von 50 ml Äthylacetat abgestoppt. Bei den Versuchen mit der Methode mit internem Standard wurden nun in jeden Erlenmeyerkolben konstante Mengen von ca. 500 000 dpm ^{14}C-markierter Steroide entsprechend der zu erwartenden Metaboliten Östron, Östradiol, Androstendion und Testosteron zugegeben. Dieser sog. interne Standard diente zur Berechnung der Wiederauffindungsraten bzw. zur Ermittlung der Umwandlungsraten.

3.3.3. Extraktion der Steroide

Die Extraktion erfolgte in Schütteltrichtern mit Teflonhähnen durch dreimaliges Schütteln für jeweils 2 Minuten. Die sich nach dem Schütteln gebildete untere Phase, die Gewebebestandteile enthielt, wurde wieder in den Erlenmeyerkolben gegeben, während die obere Phase, das Äthylacetat mit den darin gelösten Steroiden, in einem Rundkolben aufgefangen wurde. Die Gewebebestandteile im Erlenmeyerkolben wurden in analoger Weise noch zweimal ausgeschüttelt. Der gesammelte Überstand in den Rundkolben wurde dann mittels eines Rotationsverdampfers unter Vakuum eingetrocknet, anschließend mit Äthylacetat wieder gelöst und in Reagenzgläser übertragen. Um die sich aus dem 17β-Androstendiol während der Inkubation gebildeten Metaboliten bei der nachfolgenden Dünnschichtchromatographie identifizieren zu können, wurden bei der Methode mit internem Standard entsprechend der zu erwartenden Hormone Östron, Östradiol, Androstendion und Testosteron diese als nicht markierte Steroide zugegeben. Dazu wurden ca. 0,8 - 1,0 ml einer Lösung verwendet, die das entsprechende kristalline Hormon in einer Konzentration von 1 ml Methanol zu 1 ml Substanz enthielt. Dieser sog. Kaltstandard, der sich durch gleiches chemisches Verhalten wie das entsprechende radioaktive Hormon auszeichnete, ergab nachher bei der Dünnschichtchromatographie auf den Platten einen weißen Fleck, der so die Lokalisation der Hormone auf den Platten anzeigte.

Bei den Versuchen mit der Doppelisotopenmethode wurden im ersten Versuch nur Östron, Östradiol und Testosteron, bei den restlichen 5 Versuchen nur Östron und Östradiol isoliert. Auch hier wurden die entsprechenden nicht-

markierten Steroide als Kaltstandard in gleicher Weise zugegeben.

3.3.4. Auftrennung und Reinigung der Steroide durch Dünnschichtchromatographie

Die Auftrennung und Reinigung der Steroide erfolgte durch verschiedene Lösungsmittelsysteme (s. Tab. 4), deren günstigste Zusammensetzung zu Beginn der gesamten Versuchsreihen für jedes Hormon bestimmt worden war.

Die vorherige Auftrennung der Steroide durch eine Gradientenelutionssäulenchromatographie erübrigte sich, da unter analogen Versuchsbedingungen gezeigt worden war[177], daß sich die Umwandlungsraten bei alleiniger Reinigung und Isolierung der Steroide durch Dünnschichtchromatographie nicht von denen bei zusätzlich durchgeführter Gradientenelutionssäulenchromatographie unterscheiden.

Nach erneuter Eintrocknung der aus dem Rundkolben mittels Äthylacetat in Reagenzgläser übertragenen Steroide wurden diese mit einigen Tropfen Äthylacetat wieder gelöst und auf Dünnschichtplatten aufgetragen. Diese Glasplatten (20 x 20 cm) wurden vor der Beschichtung mit Alkohol und Äther abgewischt. Die Beschichtung erfolgte mit einem von Stahl entwickelten Gerät der Firma Desaga, indem Silica Gel G (nach Stahl) in einer Schichtdicke von 0,25 mm aufgetragen wurde. Das Silica Gel wurde zuvor im Verhältnis 1 : 2 mit Aqua dest. 1 - 2 Minuten gemischt. Die beschichteten Platten wurden sodann bei Zimmertemperatur getrocknet und anschließend etwa 1 Stunde im Trockenofen bei 110° C aktiviert.

Die Platten wurden dann je nach Bedarf in zwei oder drei Bahnen geteilt, so daß eine eventuelle Berührung der aufgetragenen Hormone nicht möglich war. Dann wurde der Inhalt der einzelnen Reagenzgläser auf die dafür vorgesehenen Bahnen mit Einmalpipetten (Pasteur) etwa 2 cm vom unteren Rand entfernt möglichst kleinflächig aufgetragen.

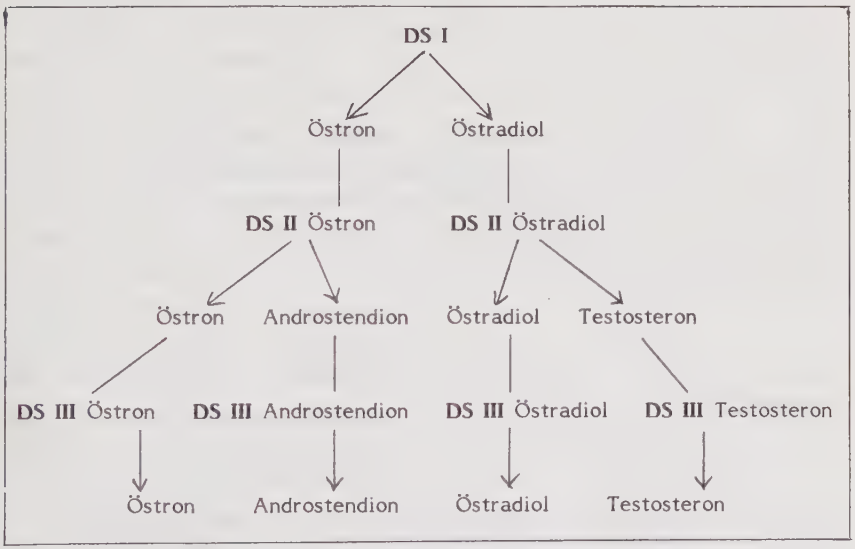
Nach kurzem Antrocknen wurden die Platten in verschließbare Glasbehälter mit den entsprechenden Lösungsmittelsystemen (s. Tab. 4) gestellt. Bevor sich die Lösungsmittelfront bis an das obere Ende der Platte vorschieben konnte, wurden die Platten aus den Behältern herausgenommen und an der Luft getrocknet. Mußte eine Platte in einem System zweimal entwickelt werden, so wurde sie nach dem Trocknen an der Luft erneut in den Behälter

Tab. 4: **Lösungsmittelsysteme für die Entwicklung der einzelnen Dünnschichten (DS)**

System	Zusammensetzung			Verhältnis
DS I	Chloroform	:	Äthylacetat	130 : 70
DS II Östron	Chloroform			200
DS III Östron	Isooctan	:	Äthylacetat	130 : 70
DS III Androstendion	Dichlormethan	:	Dioxan	190 : 10
DS II Östradiol	Isooctan	:	Äthylacetat	130 : 70
DS III Östradiol	Chloroform			200
DS III Testosteron	Dichlormethan	:	Äther	190 : 10

DS I und DS II Östradiol wurden 2 mal entwickelt.

Schema 2: **Darstellung der verschiedenen Reinigungsschritte durch Dünnschichtchromatographie**



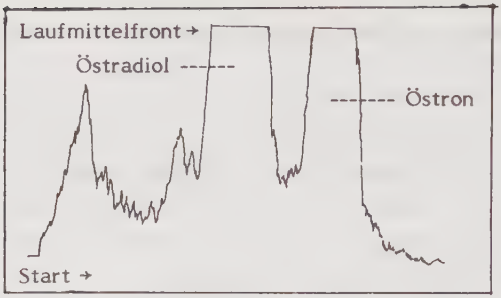


Abb. 2: **Dünnschichtchromatographie DS I**
Trennung von Östron und Östradiol

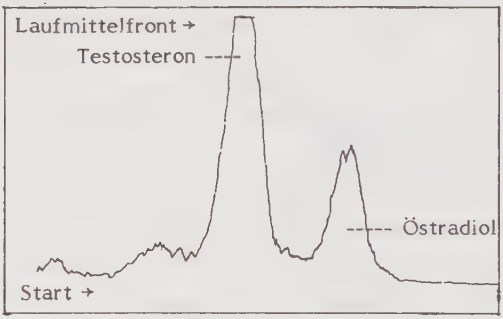


Abb. 3: **Dünnschichtchromatographie DS II Östradiol**
Trennung von Östradiol und Testosteron

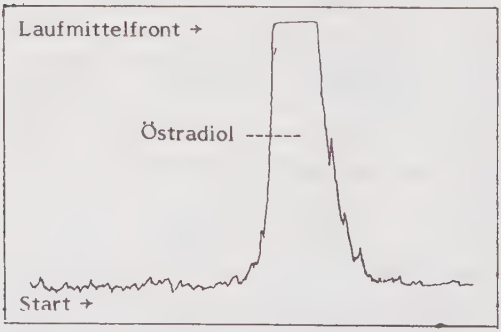


Abb. 4: **Dünnschichtchromatographie DS III Östradiol**
Reindarstellung von Östradiol

gebracht. Anschließend erfolgte die Lokalisation der radioaktiv markierten Steroide auf den Dünnschichtplatten mittels eines Scanners der Firma Berthold (Modell LB 2723), hierbei wurden die Radioaktivitätsmaxima durch einen Linearschreiber aufgezeichnet.

Durch Besprühen der Platten mit Aqua bidest. stellten sich die vorher zugegebenen nicht markierten Steroide (Kaltstandard) als weiße Flecken auf den Platten dar. Die Lage des Flecks auf der Platte entprach dem durch den Scanner dargestellten Radioaktivitätsmaximum (s. Abb. 2 - 4) und zeigte so die Identität des jeweils zu isolierenden Hormons an (s. 3.3.3.).

Dieser weiße Fleck wurde eingekreist und mit Hilfe einer Rasierklinge möglichst vollständig abgekratzt und in eine Glasfritte (s. Abb. 5), die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen war, eingefüllt. Die Steroide wurden dann mit Äthylacetat aus dem Silica-Gel in Reagenzgläser eluiert. Das Eluat wurde wieder eingetrocknet und erneut auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen, die wieder in dem entsprechenden Lösungsmittelsystem (s. Tab. 4) entwickelt wurde. Dieser Vorgang wiederholte sich bis zur vollständigen Reindarstellung der zu isolierenden Steroide.

Waren bei der Methode mit internem Standard insgesamt sieben Reinigungsschritte mit jeweiliger Entwicklung einer Dünnschichtplatte erforderlich, um die zu isolierenden Steroide Testosteron, Androstendion, Östradiol und Östron zu trennen bzw. möglichst rein darzustellen, so brauchten bei der Doppelisotopenmethode entsprechend der lediglich zwei darzustellenden Steroide Östron und Östradiol insgesamt nur drei Platten entwickelt zu werden (s. Schema 2). Eine einwandfreie Trennung der vier Steroide konnte in jedem Versuch erzielt werden, wobei einige Male bei zunächst nicht optimaler Trennung die Platten nochmals in demselben System entwickelt wurden.

3.3.5. Acetylierung der Steroide

Nach Beendigung der drei ersten Dünnschichten, nachdem sich Androstendion und Östron von Testosteron und Östradiol getrennt hatten, wie aus Schema 2 und Abb. 2 - 4 zu entnehmen ist, wurde eine Acetylierung vorgenommen, um dadurch eine verstärkte Polarität und somit noch bessere Trennung der Steroide zu erreichen. Auch Androstendion, das aufgrund fehlender Hydroxylgruppen nicht acetyliert werden kann, wurde der Acetylierung unterzogen, da so eventuell vorhandene acetylierbare Verunreinigungen abgetrennt werden

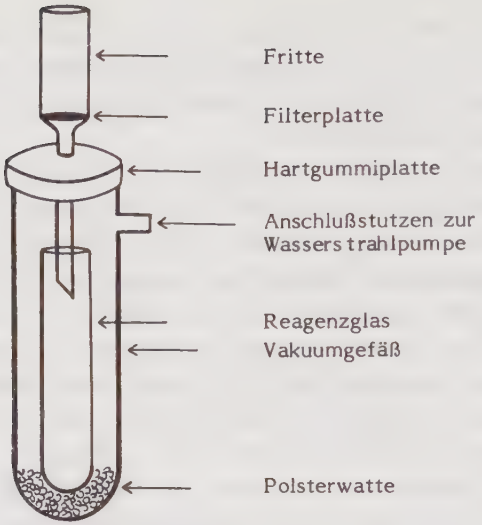


Abb. 5: **Aufbau der Glasfritte**

konnten.

In jedes Reagenzglas wurden 0,5 ml Pyridin und 0,5 ml Essigsäureanhydrid pipettiert. Nach 12 - 16 Stunden wurde die Acetylierungsreaktion durch Absaugen der überschüssigen Reagenzien unter Vakuum im Wasserbad bei 80°C beendet.

3.3.6. Kristallisation der Steroide

Vor Beginn der Kristallisation wurde das Eluat der letzten Dünnschicht, nachdem sich jedes der zu isolierenden Hormone rein dargestellt hatte, wieder eingetrocknet.

Bei den Versuchen mit der Methode mit internem Standard wurden nun in jedes Reagenzglas 10 ml Äthylacetat pipettiert, gut gemischt und anschließend 1/20 entsprechend 0,5 ml entnommen und in ein Plastikzählröhrchen gegeben. Dieses 1/20 diente zusammen mit dem 1/100, das zu Anfang der Versuchsreihe entnommen worden war (s. 3.3.1.), zur Berechnung der Wiederauffindungsrate. Nach erneuter Eintrocknung erfolgte dann mittels Äthylacetat eine Übertragung in dünnwandige Kristallisationsgläschen.

Bei der Doppelisotopenmethode konnte dieser Versuchsschritt sofort nach Beendigung der letzten Dünnschicht vorgenommen werden, da aufgrund des unterschiedlichen Versuchsprinzips keine Wiederauffindungsrate gemessen wurde bzw. gemessen werden konnte.

Nach Übertragung des eingetrockneten Eluats in die Kristallisationsgläschen wurde das Lösungsmittel durch Stickstoffventilation wieder entfernt.

In jedes Kristallisationsgläschen wurde nun entsprechend dem darin enthaltenen Steroid, das Acetylierungsprodukt in kristalliner Form beigegeben. Die günstigste Menge stellte sich im Laufe der Untersuchungen heraus, da die Fähigkeit der einzelnen Steroide, Kristalle zu bilden, unterschiedlich war. So bereitete z. B. die Kristallisation des Östradiols manchmal Schwierigkeiten, teilweise konnten erst nach mehreren Versuchen echte Kristalle erhalten werden.

Die sich im Kristallisationsgläschen befindlichen angetrockneten Steroide wurden dann zusammen mit den zugegebenen acetylierten kristallinen Steroiden in einigen Millilitern Methanol im Wasserbad bei 80°C gelöst.

Um ein ideales Kristallisationsmilieu zu erhalten, wurden vorsichtig einige Tropfen Diäthyläther in das Gläschen zugegeben, dadurch wurde eine Einengung der in Lösung gegangenen Steroide erreicht.

Nach kurzem Aufkochen wurde die Ausfällung der Kristalle bei Zimmertemperatur abgewartet. Nach der Ausfällung wurde die Flüssigkeit, die sich über den Kristallen gebildet hatte, die sog. Mutterflüssigkeit, mit einer Einmalpipette abgenommen und in ein Zählröhrchen gefüllt. Der Kristall wurde dann vorsichtig in mehrere Teile zerlegt, und ungefähr ein Drittel davon wurde ebenfalls in ein Zählröhrchen gegeben. Der Rest des Kristalls wurde dann wieder mit Methanol im Wasserbad aufgelöst und in analoger Weise wurden noch zwei Kristallisationen durchgeführt. Die hierbei verwendeten Lösungsmittelsysteme sind aus Tabelle 5 zu entnehmen.

Da nur das Steroid, das dieselbe Struktur wie das bekannte als kristallines Acetat zugegebene Steroid hatte, auskristallisieren konnte, war durch die Kristallisation die Identität, die schon durch die Dünnschichtchromatographie gegeben war, endgültig gesichert. Als letzter Reinigungsschritt war die Kristallisation von großer Bedeutung, da die einzelnen Hormone trotz durchweg guter Trennung durch die Dünnschichtchromatographie doch noch Verunreinigungen aufwiesen.

Tab. 5: **Lösungsmittel für die Kristallisation**

I.	Methanol	:	Diäthyläther
II.	Methanol	:	Ligroin
III.	Methanol	:	Cyclohexan

Dies konnte an der unterschiedlichen Höhe der Ratios der drei während des Kristallisationsvorgangs erhaltenen Mutterflüssigkeiten, die die nicht auskristallisierbaren Substanzen enthielten, abgelesen werden, wobei sich bei einigen Versuchen eine deutlich höhere Ratio der ersten Mutterflüssigkeit gegenüber der zweiten und dritten fand.
Eine saubere und endgültige Reindarstellung der Steroide war bei unseren Versuchen jedoch durchweg gegeben, wie die zumindest während der zweiten und dritten Kristallisation konstant gemessenen Ratios der Kristalle sowie der Mutterflüssigkeiten zeigen.

3.3.7. Messung der Radioaktivität

Nachdem alle drei Kristallisationen abgeschlossen waren, wurde der Inhalt der Zählröhrchen (Niederdruckpolyäthylen NEN platic LSC vial Ne F-938), wobei von jedem isolierten Steroid drei Mutterflüssigkeiten und drei Kristalle vorhanden waren, eingetrocknet.
In jedes der Zählröhrchen, einschließlich der zwischenzeitlich kühl gelagerten Röhrchen mit dem bei Inkubationsbeginn entnommenen 1/100 der Ausgangsradioaktivität und dem nach der Kristallisation bei der Methode mit internem Standard entnommenen 1/20 der noch vorhandenen Radioaktivität, wurden 15 ml Szintillationsflüssigkeit, die aus einer Mischung von 960 ml Toluol und 40 ml Permafluor 25 x der Firma Packard bestand, zugegeben.
Nach Temperaturausgleich erfolgte die Messung der vorhandenen Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer der Firma Packard, Modell 544, wobei jede Probe dreimal 2 Minuten lang gemessen wurde.

3.3.8. Berechnung der Umwandlungsraten

Entsprechend der beiden angewendeten unterschiedlichen Untersuchungsmethoden ergaben sich ebenfalls voneinander abweichende Arten der Berechnung der Umwandlungsraten.

Bei der Doppelisotopenmethode lag folgender Gedanke zugrunde: das Ausgangsverhältnis (AV), das durch das von den Ansätzen zu Beginn der Versuche entnommene 1/100 (s. 3.3.1.) dargestellt wird, entspricht dem Quotienten ^{3}H-17β-Androstendiol/^{14}C-Östradiol. Da sich im Laufe der Inkubation ^{3}H-17β-Androstendiol zu ^{3}H-Östradiol umwandelt (s. Ergebnisteil), stellt der Quotient ^{3}H-Östradiol/^{14}C-Östradiol das Endverhältnis (EV) dar. Das Endverhältnis ergab sich aus dem Mittelwert der Ratios, die in den drei Kristallisationen bzw. in der zweiten und dritten Kristallisation ermittelt wurden.

Also kann folgende Gleichung aufgestellt werden, wobei U die Umwandlungsrate darstellt:

$$U = \frac{EV}{AV} \times 100$$

Die auf diese Weise berechneten Umwandlungsraten müssen jedoch mit einigen Einschränkungen betrachtet werden: sowohl das ^{3}H-markierte als auch das ^{14}C-markierte Östradiol werden zu Östron weiterverstoffwechselt (s. Ergebnisteil) und somit liegt kein Endverhältnis im eigentlichen Sinne vor.

Bei der Methode mit internem Standard mußten die Umwandlungsraten über die Wiederauffindungsraten berechnet werden. Da die zu isolierenden Steroide, also die sich aus dem ^{3}H-markierten 17β-Androstendiol während der Inkubation gebildeten Metaboliten Testosteron, Androstendion, Östradiol und Östron nach der Inkubation, jedoch vor der Extraktion als ^{14}C-markierte Steroide dem Inkubat zugesetzt worden waren, konnte diese Menge gleich 100 % gesetzt werden. Die Wiederauffindungsraten konnten nun mit der Anzahl der dpm des vor der Kristallisation, d. h. nach teilweisem Verlust der Radioaktivität, entnommenen 1/20 (s. 3.3.6.) berechnet werden.

Da vorausgesetzt werden konnte, daß der Verlust an ^{14}C-markierter Aktivität, der der ^{3}H-markierten Aktivität entsprach, konnten die aus der ^{14}C-markierten Aktivität errechneten Wiederauffindungsraten auf die ^{3}H-markierte

Aktivität übertragen werden. Desweiteren konnten nun die absolute ^{3}H-Aktivität und die Umwandlungsraten berechnet werden.

Da trotz guter Trennung der einzelnen Metaboliten durch die verschiedenen Dünnschichtsysteme bei der Kristallisation noch teilweise Verunreinigungen vorlagen (s. 3.3.6.), wurde die Genauigkeit der Methode erhöht, indem ein Korrekturfaktor errechnet wurde, der mit der Umwandlungsrate multipliziert wurde.

Die Berechnung der Umwandlungsraten erfolgte nach folgenden Formeln:

$$\frac{a \times 100}{b} = c$$

$$\frac{d \times 100}{c} = e$$

$$\frac{e \times 100}{f} = g$$

$$\frac{h}{i} = j$$

a = wiederaufgefundene ^{14}C-markierte Aktivität in dpm

b = nach der Inkubation zugegebene Menge an ^{14}C-markierter Aktivität in dpm

c = Wiederauffindungsrate in %

d = wiederaufgefundene ^{3}H-markierte Aktivität in dpm

e = berechnete, nach der Inkubation vorhandene ^{3}H-markierte Aktivität in dpm

f = inkubierte ^{3}H-markierte Aktivität in dpm

g = Umwandlungsrate in %

h = konstantes Verhältnis der Ratios der Kristalle

i = Ratio des 1/20

j = Korrekturfaktor

3.3.9. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Miller[148], die eine Modifikation der Methode von Lowry et al.[134] darstellt, durchgeführt.

Folgende Reagenzien wurden verwendet:

a) Lösung aus 10 % Na_2CO_3 in 0,5 N NaOH
b) Lösung aus 0,5 % $CuSO_4$ und 1 % Na-K-Tartrat
c) Folin : Folin-Ciocaltens Phenolreagenz (Merck 9001), verdünnt mit Aqua bidest. im Verhältnis 1 : 11

Durchführung der Bestimmung:

Zunächst wurden die zu Beginn der Versuche in Plastikgefäße abgefüllten und zwischenzeitlich eingefrorenen Proben, die ca. 10 ml des zentrifugierten Homogenats enthielten, bei Zimmertemperatur aufgetaut, gut durchgeschüttelt und im Verhältnis 1 : 80 mit Aqua bidest. gemischt.
Dann wurde Reagenz a) mit Reagenz b) im Verhältnis 1 : 1 gemischt.

Für die Messung wurden angesetzt:

1 ml verdünntes Homogenat
1 ml des Gemischs aus a) und b)

Für den Leerwert wurden angesetzt:

1 ml Aqua bidest.
1 ml des Gemischs aus a) und b)

Nach gutem Durchschütteln wurden beide Proben für 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurden rasch 3 ml des verdünnten Phenolreagenz zugegeben. Nach gutem Durchschütteln erfolgte die Inkubation im Wasserbad bei 50° C für 10 Minuten. Nach Abkühlung bei Zimmertemperatur wurde der Ansatz bei 578 nm im Photometer gegen den Leerwert gemessen. Der Proteingehalt der einzelnen Proben wurde dann auf einer vorher mit bekannten Konzentrationen von Rinder-Albumin angefertigten Eichkurve (s. Abb. 6) abgelesen, wobei aufgrund der bestehenden Verdünnung noch mit dem Faktor 80 multipliziert werden mußte.

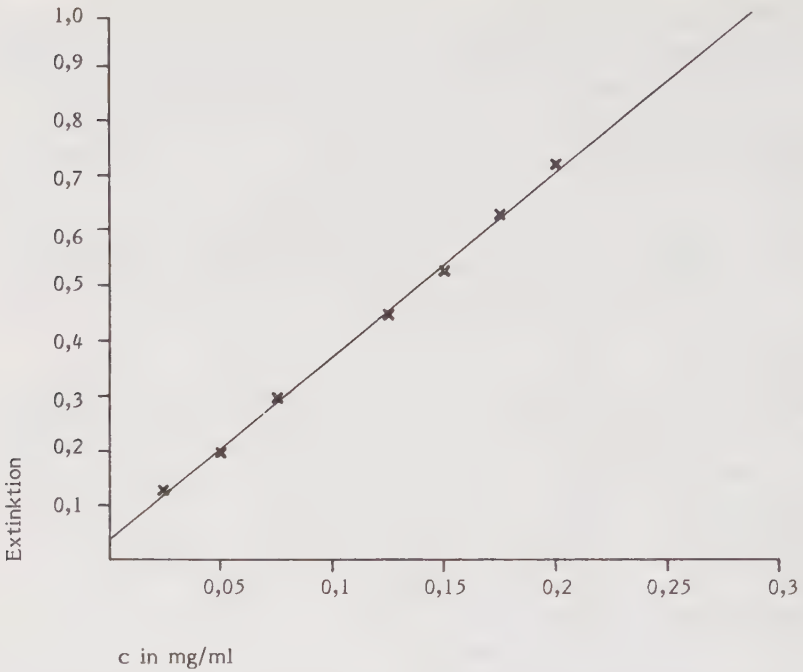


Abb. 6: **Eichkurve mit bekannten Konzentrationen von Rinder-Albumin (c)**

IV. Ergebnisse der Untersuchungen

Der erste Versuch erfolgte, wie schon erwähnt (s. 3.1.), unter dem Aspekt einer eventuell vorhandenen direkten Aromatisierung des 17β-Androstendiols zu Östradiol durch menschliches Placentahomogenat.

Der Versuch wurde mit der Doppelisotopenmethode ausgeführt und nach verschiedenen Inkubationszeiten (15 min, 30 min, 1 h, 2 h und 4 h) wurden Testosteron, Östradiol und Östron isoliert.

Da uns aus Untersuchungen anderer Autoren (s. 6.1.) bekannt war, daß aus 17β-Androstendiol nach Inkubation mit unterschiedlichen Geweben Testosteron entstehen kann, und andererseits angenommen wurde, daß sich ^{14}C-Östradiol nicht in Testosteron umwandelt, und somit wegen Fehlens der ^{14}C-Aktivität

im Testosteron keine Ratio bzw. keine Umwandlungsrate des 17β-Androstendiols zu Testosteron gemessen werden konnte, wurde analog den Versuchen mit internem Standard (s. Placenta 2 - 11) nach Beendigung der Dünnschichtchromatographie 1/20 des Eluats entnommen, um den Metaboliten quantitativ bestimmen zu können.
Da aber hier kein interner Standard zugegeben worden war, konnte die aufgefundene ^{3}H-markierte Aktivität nicht entsprechend der Wiederauffindungsrate korrigiert werden, so daß die berechneten Umwandlungsraten von 17β-Androstendiol zu Testosteron zu niedrig sind.

Es wurden ca. 22,6 Mio dpm Androst-5-en-3β,17β-diol,7-^{3}H und 5 Mio dpm Östradiol-4-^{14}C mit 1 g Placentagewebe inkubiert.

Wie aus Tab. 9 zu ersehen ist, wird ein erheblicher Anteil des 17β-Androstendiols in Testosteron umgewandelt, eine direkte Umwandlung des Steroids 17β-Androstendiol in Östradiol konnte jedoch nicht gezeigt werden.
Um die Verstoffwechselung des 17β-Androstendiols in der menschlichen Placenta darzustellen, wurde bei den folgenden Versuchen (Placenta 2 - 11) die Methode mit internem Standard (s. 3.3.) angewendet.
Da die Umwandlung von Testosteron einerseits zu Androstendion, andererseits zu Östradiol und die des Androstendions zu Östron als gesichert gilt (s. 6.2., 6.3, 6.4.), wurden die vier Metaboliten Testosteron, Androstendion, Östradiol und Östron isoliert.
Bei den Placenten 7 - 12 arbeiteten wir parallel mit der Doppelisotopenmethode, da wir uns vom Vergleich der Ergebnisse beider Methoden eine noch bessere Darstellung der Verstoffwechselung des 17β-Androstendiols in der menschlichen Placenta erhofften.
Im folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen aufgeführt.

Tab. 6: Ratios des Metaboliten Östron nach verschiedenen Inkubationszeiten bei Placenta (P) 1 mit der Doppelisotopenmethode

	t_1= 15 min	t_2= 30 min	t_3= 60 min
1/100	4,582	4,554	4,476
1. Mf	0,269	0,553	0,941
2. Mf	0,230	0,568	0,852
3. Mf	0,125	0,501	0,673
1. Kr	0,145	0,401	0,805
2. Kr	0,140	0,408	0,743
3. Kr	0,142	0,405	0,748

	t_4=120 min	t_5=240 min
1/100	4,468	4,527
1. Mf	1,207	1,636
2. Mf	1,275	1,676
3. Mf	1,243	1,693
1. Kr	1,384	1,749
2. Kr	1,323	1,695
3. Kr	1,324	1,700

Tab. 7: Ratios des Metaboliten Östradiol nach verschiedenen Inkubationszeiten bei Placenta (P) 1 mit der Doppelisotopenmethode

	t_1= 15 min	t_2= 30 min	t_3= 60 min
1/100	4,582	4,554	4,476
1. Mf	0,461	0,737	1,566
2. Mf	0,240	0,316	0,833
3. Mf	0,111	0,302	0,733
1. Kr	0,145	0,293	0,774
2. Kr	0,140	0,297	0,776
3. Kr	0,142	0,296	0,773

	t_4=120 min	t_5=240 min
1/100	4,468	4,527
1. Mf	1,101	1,027
2. Mf	1,132	1,080
3. Mf	1,109	1,111
1. Kr	1,197	1,128
2. Kr	1,194	1,127
3. Kr	1,195	1,125

Tab. 8: Umwandlungsraten von 17 β-Androstendiol zu Östradiol nach verschiedenen Inkubationszeiten bei Placenta 1

t (min)	Umwandlungsrate [%]
15	3,11
30	6,49
60	17,30
120	26,73
240	24,89

Tab 9: Wiederaufgefundene Aktivität bzw. nicht korrigierte Umwandlungsraten des Testosterons nach verschiedenen Inkubationszeiten bei Placenta 1

t (min)	Aktivität [dpm]	Umwandlungsrate [%]
15	3 371 360	15,30
30	2 292 700	10,40
60	3 510 220	15,56
120	1 990 260	9,95
240	846 080	4,23

Tab. 10: **Ratios des Metaboliten Östron nach t = 5 min mit der Methode mit internem Standard**

	P_3	P_4	P_5	P_6
1/20	11,447	0,756	2,393	2,985
1. Mf	9,181	1,426	2,532	3,818
2. Mf	9,598	0,921	2,061	3,098
3. Mf	9,488	0,619	2,032	2,939
1. Kr	11,354	0,668	2,011	2,782
2. Kr	11,130	0,509	2,111	2,808
3. Kr	11,151	0,507	2,126	2,852

Tab. 11: **Ratios des Metaboliten Östradiol nach t = 5 min mit der Methode mit internem Standard**

	P_3	P_4	P_5*	P_6
1/20	1,917	3,938		0,491
1. Mf	4,850	19,943		0,939
2. Mf	2,408	0,723		0,538
3. Mf	1,531	0,251		0,513
1. Kr	1,435	1,751		0,422
2. Kr	1,389	0,095		0,439
3. Kr	1,401	0,077		0,426

[* Versuch aus technischen Gründen nicht auswertbar]

Tab. 12: **Ratios des Metaboliten Androstendion nach t = 5 min mit der Methode mit internem Standard**

	P_3	P_4	P_5	P_6
1/20	0,707	3,117	2,583	7,394
1.Mf	0,874	2,933	2,790	7,593
2.Mf	0,688	2,863	2,863	6,673
3.Mf	0,704	2,948	2,759	6,169
1.Kr	0,663	3,027	2,713	7,264
2.Kr	0,660	3,014	2,542	7,212
3.Kr	0,608	3,024	2,571	7,161

Tab. 13: **Ratios des Metaboliten Testosteron nach t = 5 min mit der Methode mit internem Standard**

	P_3	P_4	P_5*	P_6
1/20	2,682	11,057		13,651
1.Mf	3,270	11,371		14,324
2.Mf	2,805	10,870		14,901
3.Mf	2,750	10,723		12,748
1.Kr	2,586	10,894		12,039
2.Kr	2,546	9,837		11,633
3.Kr	2,540	9,800		11,579

[* Versuch aus technischen Gründen nicht auswertbar]

Tab. 14: **Ratios des Metaboliten Östron nach t = 15 min mit der Methode mit internem Standard**

	P_2	P_3	P_4*	P_5
1/20	13,476	15,083		16,080
1.Mf	14,131	13,670		15,083
2.Mf	14,298	13,510		15,369
3.Mf	14,437	14,771		15,505
1.Kr	14,425	16,177		14,818
2.Kr	13,585	16,314		14,921
3.Kr	14,548	16,104		15,000

[* Versuch aus technischen Gründen nicht auswertbar]

	P_6	P_7	P_8	P_9
1/20	15,139	16,532	7,888	33,451
1.Mf	14,693	19,074	7,260	33,276
2.Mf	15,378	15,174	7,160	32,819
3.Mf	15,132	14,968	7,414	33,682
1.Kr	15,244	16,058	7,948	33,363
2.Kr	15,101	15,877	7,861	33,574
3.Kr	15,000	16,011	7,941	33,412

	P_{10}	P_{11}
1/20	16,011	32,223
1.Mf	14,536	29,169
2.Mf	14,588	32,585
3.Mf	14,681	27,652
1.Kr	14,843	29,609
2.Kr	14,699	28,480
3.Kr	14,935	28,467

Tab. 15: **Ratios des Metaboliten Östradiol nach t = 15 min mit der Methode mit internem Standard**

	P_2	P_3	P_4	P_5
1/20	1,146	1,765	0,827	2,735
1.Mf	1,333	2,749	3,823	8,983
2.Mf	1,110	1,923	1,344	1,657
3.Mf	1,148	1,693	0,589	1,493
1.Kr	1,136	1,592	0,429	2,089
2.Kr	1,072	1,576	0,266	1,285
3.Kr	1,120	1,577	0,253	1,283

	P_6	P_7	P_8	P_9
1/20	0,919	2,685	0,836	2,917
1.Mf	1,147	7,410	2,613	3,889
2.Mf	1,069	3,517	1,368	3,632
3.Mf	1,052	1,673	0,781	3,339
1.Kr	1,006	1,580	0,546	2,789
2.Kr	1,034	1,726	0,339	2,728
3.Kr	1,013	1,541	0,330	2,720

	P_{10}	P_{11}
1/20	5,156	2,622
1.Mf	1,396	2,834
2.Mf	1,413	2,528
3.Mf	1,152	2,458
1.Kr	1,165	2,465
2.Kr	1,066	2,444
3.Kr	1,164	2,450

Tab. 16: **Ratios des Metaboliten Androstendion nach t = 15 min mit der Methode mit internem Standard**

	P_2	P_3	P_4*	P_5
1/20	0,101	0,169		2,805
1.Mf	0,280	0,436		3,558
2.Mf	0,111	0,166		2,921
3.Mf	0,110	0,079		2,676
1.Kr	0,113	0,105		2,711
2.Kr	0,115	0,100		2,532
3.Kr	0,114	0,102		2,476

[* Versuch aus technischen Gründen nicht auswertbar]

	P_6	P_7	P_8	P_9
1/20	3,238	2,449	4,316	0,354
1.Mf	3,345	3,819	5,597	0,357
2.Mf	3,237	2,461	4,538	0,283
3.Mf	3,066	2,102	4,060	0,294
1.Kr	2,982	1,761	3,709	0,278
2.Kr	2,744	1,678	3,561	0,287
3.Kr	2,898	1,673	3,574	0,275

	P_{10}	P_{11}
1/20	2,209	0,811
1.Mf	2,112	1,042
2.Mf	2,209	0,751
3.Mf	2,092	0,653
1.Kr	2,049	0,699
2.Kr	2,044	0,645
3.Kr	2,070	0,647

Tab. 17: **Ratios des Metaboliten Testosteron nach t = 15 min mit der Methode mit internem Standard**

	P_2	P_3	P_4	P_5
1/20	0,399	0,245	12,217	12,878
1.Mf	1,397	0,785	11,684	13,814
2.Mf	0,398	0,173	12,198	12,068
3.Mf	0,187	0,118	11,519	12,825
1.Kr	0,167	0,156	12,020	12,826
2.Kr	0,140	0,148	11,739	12,812
3.Kr	0,140	0,150	11,785	12,853

	P_6	P_7	P_8	P_9
1/20	11,949	5,852	14,341	1,171
1.Mf	12,114	7,666	13,629	1,603
2.Mf	12,675	5,549	14,212	1,165
3.Mf	10,914	5,420	13,496	0,998
1.Kr	12,057	5,219	13,158	0,904
2.Kr	10,671	5,501	13,330	0,900
3.Kr	10,630	5,574	13,310	0,900

	P_{10}	P_{11}
1/20	10,298	0,743
1.Mf	10,634	1,274
2.Mf	9,669	0,635
3.Mf	9,463	0,556
1.Kr	9,454	0,533
2.Kr	10,142	0,526
3.Kr	10,215	0,528

Tab. 18: **Ratios des Metaboliten Östron nach t = 30 min mit der Methode mit internem Standard**

	P_2	P_3	P_4	P_5
1/20	15,514	17,129	2,858	29,425
1.Mf	16,398	14,396	2,797	25,912
2.Mf	16,628	16,023	2,626	26,442
3.Mf	16,732	15,136	2,821	26,453
1.Kr	16,598	16,870	2,723	26,242
2.Kr	16,878	17,093	2,679	26,337
3.Kr	16,615	16,924	2,812	26,330

	P_6	P_7	P_8	P_9
1/20	25,604	20,136	13,327	35,934
1.Mf	24,981	18,072	12,243	34,351
2.Mf	25,003	17,164	13,079	36,348
3.Mf	25,000	18,043	12,078	31,780
1.Kr	25,568	19,897	13,219	32,334
2.Kr	25,300	17,960	13,262	36,107
3.Kr	25,325	18,039	13,265	32,299

	P_{10}	P_{11}
1/20	23,441	35,256
1.Mf	20,627	34,055
2.Mf	21,113	35,009
3.Mf	21,013	35,177
1.Kr	20,867	35,295
2.Kr	20,719	34,799
3.Kr	20,916	35,079

Tab. 19: **Ratios des Metaboliten Östradiol nach t = 30 min mit der Methode mit internem Standard**

	P_2	P_3	P_4*	P_5
1/20	0,701	1,095		1,907
1.Mf	0,744	1,721		2,926
2.Mf	0,670	1,294		1,952
3.Mf	0,620	1,119		1,718
1.Kr	0,619	1,042		1,771
2.Kr	0,628	0,964		1,697
3.Kr	0,631	0,961		1,704

[* Versuch aus technischen Gründen nicht auswertbar]

	P_6	P_7	P_8	P_9
1/20	1,231	2,740	0,906	2,286
1.Mf	1,639	5,395	3,149	2,503
2.Mf	1,397	3,923	1,059	2,302
3.Mf	1,248	1,997	0,616	2,214
1.Kr	1,129	1,956	0,467	2,179
2.Kr	1,242	1,801	0,462	2,243
3.Kr	1,217	1,814	0,451	2,236

	P_{10}	P_{11}
1/20	2,334	2,724
1.Mf	5,613	3,995
2.Mf	2,844	2,490
3.Mf	1,189	2,651
1.Kr	1,283	2,345
2.Kr	1,094	2,342
3.Kr	1,172	2,324

Tab. 20: **Ratios des Metaboliten Androstendion nach t = 30 min mit der Methode mit internem Standard**

	P_2	P_3	P_4	P_5
1/20	0,032	0,122	9,966	1,072
1.Mf	0,205	0,522	9,537	3,006
2.Mf	0,053	0,140	9,944	1,073
3.Mf	0,042	0,084	9,553	0,806
1.Kr	0,028	0,113	9,728	0,703
2.Kr	0,027	0,068	10,239	0,571
3.Kr	0,027	0,068	9,431	0,583

	P_6	P_7	P_8	P_9
1/20	1,064	1,834	2,944	0,035
1.Mf	1,340	3,169	3,395	0,116
2.Mf	0,937	2,074	2,833	0,030
3.Mf	1,039	1,498	2,611	0,030
1.Kr	1,125	1,463	2,612	0,031
2.Kr	0,867	1,393	2,534	0,029
3.Kr	0,860	1,344	2,571	0,030

	P_{10}	P_{11}
1/20	1,441	0,804
1.Mf	1,557	1,066
2.Mf	1,374	0,823
3.Mf	1,435	0,894
1.Kr	1,291	0,693
2.Kr	1,269	0,644
3.Kr	1,267	0,641

Tab. 21: **Ratios des Metaboliten Testosteron nach t = 30 min mit der Methode mit internem Standard**

	P_2	P_3	P_4*	P_5
1/20	0,314	0,272		6,026
1.Mf	1,040	0,753		7,312
2.Mf	0,328	0,258		5,753
3.Mf	0,121	0,211		5,466
1.Kr	0,142	0,167		5,231
2.Kr	0,065	0,173		5,586
3.Kr	0,064	0,172		5,146

[* Versuch aus technischen Gründen nicht auswertbar]

	P_6	P_7	P_8	P_9
1/20	5,829	5,396	10,939	0,449
1.Mf	6,552	6,376	10,939	1,309
2.Mf	5,218	5,579	10,976	1,024
3.Mf	5,468	4,857	10,202	0,502
1.Kr	5,319	4,596	10,205	0,193
2.Kr	5,349	4,556	10,385	0,199
3.Kr	5,368	4,449	10,108	0,193

	P_{10}	P_{11}
1/20	7,618	0,493
1.Mf	6,992	1,078
2.Mf	7,464	0,396
3.Mf	7,463	0,274
1.Kr	6,805	0,259
2.Kr	7,296	0,216
3.Kr	7,246	0,214

Tab. 22: **Ratios des Metaboliten Östron nach t = 60 min mit der Methode mit internem Standard**

	P_2	P_3	P_4	P_5
1/20	13,637	18,344	6,917	23,100
1.Mf	13,152	14,463	6,713	20,298
2.Mf	14,512	16,149	6,972	20,551
3.Mf	14,366	16,016	6,762	20,759
1.Kr	14,630	18,326	6,846	22,891
2.Kr	13,784	18,345	6,667	20,809
3.Kr	14,647	18,594	6,848	22,916

	P_6	P_7*	P_8	P_9
1/20	30,387		13,694	36,350
1.Mf	29,040		13,598	35,577
2.Mf	29,207		13,218	35,846
3.Mf	29,664		13,234	36,304
1.Kr	30,154		13,680	36,232
2.Kr	29,488		13,382	36,113
3.Kr	30,195		13,234	36,271

[* Versuch aus technischen Gründen nicht auswertbar]

	P_{10}	P_{11}
1/20	29,263	35,389
1.Mf	26,692	35,126
2.Mf	25,832	32,798
3.Mf	25,689	35,857
1.Kr	25,336	35,806
2.Kr	25,631	35,623
3.Kr	25,766	35,619

Tab. 23: **Ratios des Metaboliten Östradiol nach t = 60 min mit der Methode mit internem Standard**

	P_2	P_3	P_4	P_5
1/20	1,090	0,588	0,670	6,709
1.Mf	1,233	0,890	2,249	11,472
2.Mf	1,071	0,540	0,769	5,993
3.Mf	1,045	0,495	0,533	5,270
1.Kr	1,042	0,489	0,525	5,250
2.Kr	1,060	0,487	0,435	4,962
3.Kr	1,023	0,486	0,404	5,033

	P_6	P_7*	P_8	P_9
1/20	1,212		2,084	1,405
1.Mf	1,370		5,655	1,884
2.Mf	1,146		1,974	1,465
3.Mf	1,263		0,448	1,453
1.Kr	1,188		0,607	1,318
2.Kr	1,150		0,356	1,327
3.Kr	1,170		0,372	1,339

[* Versuch aus technischen Gründen nicht auswertbar]

	P_{10}	P_{11}
1/20	1,745	2,096
1.Mf	2,911	2,461
2.Mf	1,301	1,931
3.Mf	1,157	1,920
1.Kr	1,059	1,925
2.Kr	1,104	1,924
3.Kr	1,108	1,928

Tab. 24: **Ratios des Metaboliten Androstendion nach t = 60 min mit der Methode mit internem Standard**

	P_2	P_3	P_4	P_5
1/20	0,045	0,115	9,119	0,442
1.Mf	0,154	0,394	9,325	1,389
2.Mf	0,076	0,140	9,209	0,495
3.Mf	0,060	0,062	8,823	0,272
1.Kr	0,047	0,087	8,919	0,236
2.Kr	0,048	0,060	8,862	0,176
3.Kr	0,048	0,059	8,730	0,180

	P_6	P_7*	P_8	P_9
1/20	0,500		3,769	0,013
1.Mf	0,836		4,033	0,097
2.Mf	0,600		4,077	0,015
3.Mf	0,602		3,904	0,014
1.Kr	0,480		3,435	0,015
2.Kr	0,426		3,338	0,013
3.Kr	0,423		3,417	0,013

[* Versuch aus technischen Gründen nicht auswertbar]

	P_{10}	P_{11}
1/20	0,686	0,361
1.Mf	0,787	1,105
2.Mf	0,647	0,667
3.Mf	0,598	0,311
1.Kr	0,578	0,231
2.Kr	0,607	0,167
3.Kr	0,590	0,171

Tab. 25: **Ratios des Metaboliten Testosteron nach t = 60 min mit der Methode mit internem Standard**

	P_2	P_3	P_4	P_5
1/20	0,225	0,224	12,431	1,400
1.Mf	1,061	0,816	13,517	2,414
2.Mf	0,284	0,247	12,243	1,272
3.Mf	0,101	0,144	12,886	2,403
1.Kr	0,151	0,091	12,064	0,720
2.Kr	0,093	0,067	11,994	0,612
3.Kr	0,093	0,080	11,928	0,654

	P_6	P_7*	P_8	P_9
1/20	2,917		12,974	0,438
1.Mf	3,947		14,312	1,767
2.Mf	2,680		15,369	0,649
3.Mf	2,989		11,294	0,461
1.Kr	2,815		12,392	0,184
2.Kr	2,684		11,259	0,183
3.Kr	2,796		11,200	0,182

[* Versuch aus technischen Gründen nicht auswertbar]

	P_{10}	P_{11}
1/20	4,390	0,416
1.Mf	4,706	1,342
2.Mf	4,008	0,466
3.Mf	4,242	0,338
1.Kr	3,887	0,216
2.Kr	4,052	0,201
3.Kr	3,953	0,204

Tab. 26: **Ratios des Metaboliten Östron nach t = 120 min mit der Methode mit internem Standard**

	P_2	P_3	P_4	P_5
1/20	12,000	16,337	9,638	24,664
1.Mf	12,543	14,723	13,219	20,881
2.Mf	12,665	15,461	9,010	22,238
3.Mf	12,805	14,710	8,688	21,273
1.Kr	12,782	15,925	8,934	22,496
2.Kr	12,672	17,558	9,355	23,231
3.Kr	12,836	15,845	9,067	22,553

	P_6	P_7	P_8	P_9
1/20	27,707	25,172	13,657	36,289
1.Mf	26,827	28,161	12,625	36,901
2.Mf	27,354	25,262	13,645	36,610
3.Mf	27,150	21,231	12,441	32,076
1.Kr	27,209	22,242	13,519	36,932
2.Kr	27,000	22,396	13,520	32,691
3.Kr	27,100	22,364	13,538	32,036

	P_{10}	P_{11}
1/20	31,450	24,844
1.Mf	26,368	24,544
2.Mf	26,936	25,039
3.Mf	26,891	24,283
1.Kr	27,394	24,988
2.Kr	27,207	23,074
3.Kr	27,582	24,754

Tab. 27: **Ratios des Metaboliten Östradiol nach t = 120 min mit der Methode mit internem Standard**

	P_2	P_3	P_4	P_5
1/20	1,695	0,431	0,715	6,709
1.Mf	1,860	0,792	3,202	16,266
2.Mf	1,663	0,371	1,172	6,692
3.Mf	1,668	0,344	0,617	4,692
1.Kr	1,625	0,311	0,525	4,213
2.Kr	1,624	0,311	0,364	4,041
3.Kr	1,604	0,304	0,322	4,018

	P_6	P_7	P_8	P_9
1/20	0,917	1,319	1,191	0,994
1.Mf	1,033	2,872	3,591	1,358
2.Mf	1,083	1,219	2,404	1,165
3.Mf	0,939	0,953	0,396	1,000
1.Kr	1,007	1,106	0,558	0,932
2.Kr	0,983	0,895	0,334	0,864
3.Kr	0,940	0,913	0,323	0,916

	P_{10}	P_{11}
1/20	1,541	1,029
1.Mf	3,597	1,250
2.Mf	2,111	0,881
3.Mf	1,146	0,899
1.Kr	1,018	0,843
2.Kr	1,024	0,878
3.Kr	1,019	0,875

Tab. 28: **Ratios des Metaboliten Androstendion nach t = 120 min mit der Methode mit internem Standard**

	P_2	P_3	P_4	P_5
1/20	0,084	0,162	12,186	0,986
1.Mf	0,279	9,347	12,547	3,191
2.Mf	0,090	0,168	12,483	1,320
3.Mf	0,087	0,115	12,740	0,373
1.Kr	0,058	0,123	12,452	0,371
2.Kr	0,054	0,105	12,012	0,280
3.Kr	0,054	0,100	11,682	0,299

	P_6	P_7	P_8	P_9
1/20	0,234	1,639	6,042	0,060
1.Mf	0,342	5,784	6,488	0,143
2.Mf	0,385	2,108	5,784	0,059
3.Mf	0,205	1,478	5,518	0,054
1.Kr	0,162	1,248	5,590	0,060
2.Kr	0,155	1,125	5,222	0,051
3.Kr	0,160	1,058	5,271	0,050

	P_{10}	P_{11}
1/20	0,991	5,996
1.Mf	0,647	5,964
2.Mf	0,678	6,135
3.Mf	0,745	5,597
1.Kr	0,386	5,453
2.Kr	0,368	5,443
3.Kr	0,371	5,403

Tab. 29: **Ratios des Metaboliten Testosteron nach t = 120 min mit der Methode mit internem Standard**

	P_2	P_3	P_4	P_5
1/20	0,219	0,298	9,818	1,045
1.Mf	0,660	0,688	10,818	2,189
2.Mf	0,149	0,264	9,790	0,707
3.Mf	0,102	0,231	9,359	0,537
1.Kr	0,135	0,188	9,789	0,520
2.Kr	0,114	0,201	9,541	0,431
3.Kr	0,111	0,206	9,623	0,420

	P_6	P_7	P_8	P_9
1/20	0,567	3,698	10,721	0,470
1.Mf	0,982	9,922	13,589	1,346
2.Mf	0,742	5,143	9,528	0,723
3.Mf	0,578	3,776	9,476	0,393
1.Kr	0,411	3,194	9,341	0,173
2.Kr	0,450	3,060	9,210	0,151
3.Kr	0,441	3,019	9,239	0,145

	P_{10}	P_{11}
1/20	2,300	2,749
1.Mf	4,245	4,010
2.Mf	2,705	2,492
3.Mf	1,909	2,436
1.Kr	1,989	2,398
2.Kr	1,894	2,321
3.Kr	1,870	2,325

Tab. 30: **Ratios der Metaboliten Östron, Östradiol, Androstendion und Testosteron nach t = 240 min mit der Methode mit internem Standard bei Placenta 11**

	Östron	Östradiol	Androsteron	Testosteron
1/20	6,548	0,351	10,175	8,174
1.Mf	7,165	0,795	9,621	6,428
2.Mf	6,178	0,351	10,084	8,261
3.Mf	6,427	0,311	10,293	8,934
1.Kr	6,114	0,189	9,565	8,365
2.Kr	6,350	0,183	9,549	8,674
3.Kr	6,338	0,192	10,099	8,969

Tab. 31: **Ratios des Metaboliten Östron nach t = 15 min mit der Doppelisotopenmethode**

	P_7	P_8	P_9
1/100	29,650	42,621	36,923
1. Mf	17,324	10,620	33,906
2. Mf	19,188	10,629	30,660
3. Mf	17,156	11,331	29,409
1. Kr	17,379	11,301	35,095
2. Kr	17,165	10,964	31,294
3. Kr	17,261	10,957	31,307

	P_{10}	P_{11}
1/100	36,627	38,081
1. Mf	10,864	34,760
2. Mf	12,408	33,454
3. Mf	12,766	36,781
1. Kr	12,713	36,586
2. Kr	12,735	36,647
3. Kr	12,547	37,026

Tab. 32: **Ratios des Metaboliten Östradiol nach t = 15 min mit der Doppelisotopenmethode**

	P_7	P_8	P_9
1/100	29,650	42,621	36,923
1. Mf	10,428	5,861	63,556
2. Mf	6,062	4,804	42,785
3. Mf	4,666	4,809	32,888
1. Kr	4,224	4,626	31,665
2. Kr	4,395	4,744	30,294
3. Kr	4,286	4,597	30,638

	P_{10}	P_{11}
1/100	36,627	38,081
1. Mf	26,858	69,955
2. Mf	16,616	29,978
3. Mf	11,851	27,592
1. Kr	10,205	29,351
2. Kr	10,513	26,936
3. Kr	9,498	27,867

Tab. 33: **Ratios des Metaboliten Östron nach t = 30 min mit der Doppelisotopenmethode**

	P_7	P_8	P_9
1/100	30,359	43,111	37,246
1. Mf	18,167	12,351	40,507
2. Mf	16,685	13,072	45,222
3. Mf	16,593	12,864	36,497
1. Kr	16,829	13,239	42,030
2. Kr	18,229	12,871	37,245
3. Kr	17,207	12,402	36,803

	P_{10}	P_{11}
1/100	36,682	41,168
1. Mf	15,177	10,273
2. Mf	17,674	9,535
3. Mf	18,859	10,272
1. Kr	18,951	10,101
2. Kr	18,935	10,245
3. Kr	19,124	10,165

Tab. 34: **Ratios des Metaboliten Östradiol nach t = 30 min mit der Doppelisotopenmethode**

	P_7	P_8	P_9
1/100	30,359	43,111	37,246
1. Mf	8,524	10,454	69,218
2. Mf	7,520	5,511	37,240
3. Mf	7,271	4,890	33,157
1. Kr	7,305	4,621	29,881
2. Kr	7,339	4,320	27,188
3. Kr	7,165	4,259	27,781

	P_{10}	P_{11}
1/100	36,682	41,168
1. Mf	16,476	53,856
2. Mf	15,833	13,850
3. Mf	15,732	7,544
1. Kr	16,225	8,728
2. Kr	16,594	7,714
3. Kr	16,550	7,752

Tab. 35: Ratios des Metaboliten Östron nach t = 60 min mit der Doppelisotopenmethode

	P_7	P_8	P_9
1/100	30,319	42,786	36,910
1. Mf	17,888	16,502	41,384
2. Mf	18,918	17,049	41,711
3. Mf	18,348	18,448	41,795
1. Kr	20,541	18,431	42,221
2. Kr	20,746	18,337	42,278
3. Kr	20,511	18,312	42,326

	P_{10}	P_{11}
1/100	36,163	38,122
1. Mf	21,604	40,724
2. Mf	19,986	40,671
3. Mf	24,741	41,523
1. Kr	24,714	40,958
2. Kr	24,622	41,104
3. Kr	24,614	41,268

Tab. 36: Ratios des Metaboliten Östradiol nach t = 60 min mit der Doppelisotopenmethode

	P_7	P_8	P_9
1/100	30,319	42,786	36,910
1. Mf	16,708	3,114	35,710
2. Mf	12,689	0,841	29,959
3. Mf	11,380	0,402	31,460
1. Kr	12,230	0,291	31,360
2. Kr	12,019	0,238	28,229
3. Kr	12,037	0,227	31,462

	P_{10}	P_{11}
1/100	36,163	38,122
1. Mf	21,248	59,110
2. Mf	19,611	37,678
3. Mf	19,115	37,778
1. Kr	18,742	36,125
2. Kr	18,482	36,723
3. Kr	18,392	36,344

Tab. 37: **Ratios des Metaboliten Östron nach t = 120 min mit der Doppelisotopenmethode**

	P_7	P_8	P_9
1/100	30,210	42,575	36,465
1. Mf	19,063	14,924	39,465
2. Mf	18,358	13,793	42,573
3. Mf	18,506	14,867	42,325
1. Kr	18,680	15,803	42,465
2. Kr	18,979	14,512	42,686
3. Kr	18,716	15,705	42,671

	P_{10}	P_{11}
1/100	36,678	37,830
1. Mf	20,618	40,624
2. Mf	23,229	37,983
3. Mf	29,370	41,354
1. Kr	28,612	40,964
2. Kr	28,605	40,871
3. Kr	28,608	41,473

Tab. 38: **Ratios des Metaboliten Östradiol nach t = 120 min mit der Doppelisotopenmethode**

	P_7	P_8	P_9
1/100	30,210	42,575	36,465
1. Mf	19,815	3,204	32,638
2. Mf	15,249	4,740	28,147
3. Mf	13,181	5,129	27,889
1. Kr	12,654	5,835	24,595
2. Kr	13,144	6,283	24,159
3. Kr	12,021	6,143	24,087

	P_{10}	P_{11}
1/100	36,678	37,830
1. Mf	23,392	30,915
2. Mf	20,402	29,160
3. Mf	20,102	29,664
1. Kr	20,333	29,847
2. Kr	20,460	30,168
3. Kr	21,540	30,313

Tab. 39: **Ratios der Metaboliten Östron und Östradiol nach t = 240 min mit der Doppelisotopenmethode bei Placenta 11**

	Östron	Östradiol
1/100	41,816	41,816
1.Mf	7,673	30,319
2.Mf	7,174	15,091
3.Mf	6,779	13,947
1.Kr	7,174	5,856
2.Kr	7,275	5,683
3.Kr	6,533	5,544

Tab. 40: Ergebnisübersicht der Verstoffwechselungsraten (V) in % von 17β-Androstendiol nach verschiedenen Inkubationszeiten (t) in min mit der Methode mit internem Standard bei Placenta (P) 2-11

t	Vp_2	Vp_3	Vp_4	Vp_5	Vp_6
5		76,58	31,08	*	50,92
15	73,50	85,14	*	70,33	66,79
30	81,58	81,79	*	71,67	71,67
60	73,39	84,02	64,99	60,46	74,08
120	69,06	72,86	66,50	57,13	61,01

t	Vp_7	Vp_8	Vp_9	Vp_{10}	Vp_{11}
15	57,03	65,18	78,67	72,83	78,13
30	60,24	68,77	74,60	77,20	88,38
60	*	74,46	81,03	78,89	90,04
120	65,74	73,19	71,89	77,03	77,71
240					63,98

[* Versuch aus technischen Gründen nicht auswertbar]

Tab. 41: Ergebnisübersicht der Umwandlungsraten (U) in % von 17β-Androstendiol zu Östron nach verschiedenen Inkubationszeiten (t) in min mit der Methode mit internem Standard bei Placenta 2-11

t	Up_2	Up_3	Up_4	Up_5	Up_6
5		52,54	1,08	4,26	6,02
15	66,51	75,78	*	30,48	32,03
30	77,85	75,87	6,81	53,76	53,87
60	67,29	81,01	15,07	46,81	63,73
120	59,84	69,90	19,39	46,04	57,57

t	Up_7	Up_8	Up_9	Up_{10}	Up_{11}
15	34,63	19,62	70,14	36,16	69,09
30	40,14	33,53	69,25	50,75	80,99
60	*	33,95	77,66	66,35	84,47
120	51,98	34,21	69,43	68,11	57,46
240					15,68

[* Versuch aus technischen Gründen nicht auswertbar]

Tab. 42: Ergebnisübersicht der Umwandlungsraten (U) in % von 17β-Androstendiol zu Östradiol nach verschiedenen Inkubationszeiten (t) in min mit der Methode mit internem Standard bei Placenta 2-11

t	Up_2	Up_3	Up_4	Up_5	Up_6
5		7,19	0,19	*	0,96
15	5,75	8,07	0,61	3,01	2,27
30	3,27	4,71	*	3,99	2,74
60	5,40	2,34	0,93	11,71	2,60
120	8,39	1,46	0,71	9,44	2,09

t	Up_7	Up_8	Up_9	Up_{10}	Up_{11}
15	3,72	0,82	5,77	2,87	5,98
30	4,44	1,14	4,81	2,79	5,41
60	*	0,92	2,88	2,76	4,59
120	2,32	0,82	1,98	2,57	2,04
240					0,45

[* Versuch aus technischen Gründen nicht auswertbar]

Tab. 43: **Ergebnisübersicht der Umwandlungsraten (U) in % von 17β-Androstendiol zu Androstendion nach verschiedenen Inkubationszeiten (t) in min mit der Methode mit internem Standard bei Placenta 2-11**

t	Up_2	Up_3	Up_4	Up_5	Up_6
5		2,97	6,29	5,28	15,47
15	0,52	0,48	*	5,12	6,16
30	0,13	0,31	23,00	1,19	1,85
60	0,22	0,26	19,00	0,37	0,91
120	0,25	0,46	23,78	0,60	0,34

t	Up_7	Up_8	Up_9	Up_{10}	Up_{11}
15	3,87	8,76	0,56	4,78	1,40
30	3,26	6,14	0,06	2,95	1,33
60	*	8,24	0,03	1,36	0,36
120	2,71	12,63	0,11	0,88	11,22
240					21,04

[* Versuch aus technischen Gründen nicht auswertbar]

Tab. 44: Ergebnisübersicht der Umwandlungsraten (U) in % von 17β-Androstendiol zu Testosteron nach verschiedenen Inkubationszeiten (t) in min mit der Methode mit internem Standard bei Placenta 2-11

t	Up_2	Up_3	Up_4	Up_5	Up_6
5		13,88	23,52	*	28,47
15	0,72	0,81	29,95	31,72	26,33
30	0,33	0,90	*	12,73	13,21
60	0,48	0,41	29,99	1,57	6,84
120	0,58	1,04	22,62	1,05	1,01

t	Up_7	Up_8	Up_9	Up_{10}	Up_{11}
15	14,81	35,98	2,20	29,02	1,66
30	12,40	27,96	0,48	20,71	0,65
60	*	31,35	0,46	11,42	0,62
120	8,73	25,53	0,37	5,47	6,99
240					26,81

[* Versuch aus technischen Gründen nicht auswertbar]

Tab. 45: **Ergebnisübersicht der Umwandlungsraten (U) in % von 17β-Androstendiol zu Östradiol nach verschiedenen Inkubationszeiten (t) in min mit der Doppelisotopenmethode bei Placenta 7-11**

t	Up_7	Up_8	Up_9	Up_{10}	Up_{11}
15	14,51	10,92	82,51	27,50	71,96
30	23,95	9,95	73,79	45,18	*
60	39,67	*	85,10	50,98	95,48
120	41,73	14,30	66,15	56,65	79,94
240					13,42

[* Versuch aus technischen Gründen nicht auswertbar]

Tab. 46: **Ergebnisse der Proteinbestimmung der Placenten 1-11 nach der Methode von Miller**

Placenta	Extinktion	Proteingehalt mg/ml
1	0,211	4,50
2	0,322	6,98
3	0,220	4,74
4	0,143	3,06
5	0,140	3,06
6	0,238	5,16
7	0,220	4,74
8	0,232	5,00
9	0,288	6,20
10	0,177	3,80
11	0,220	4,74

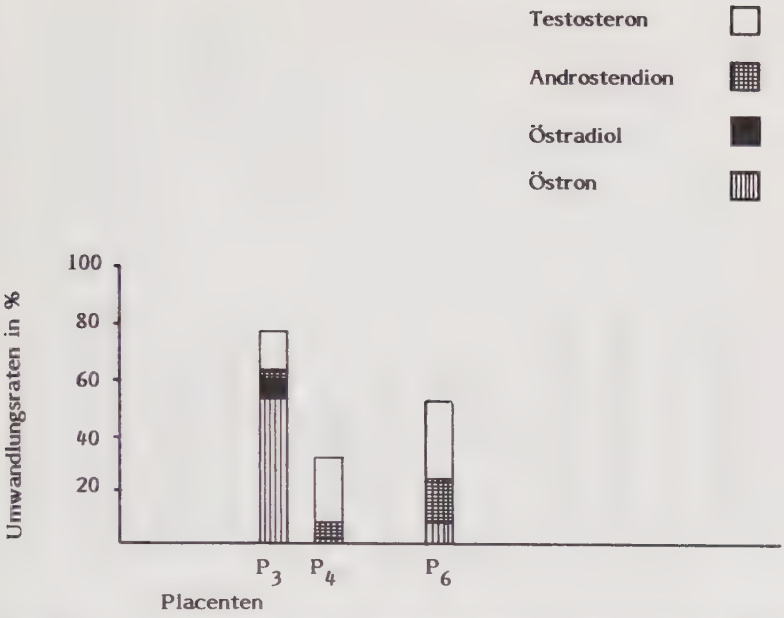


Abb. 7: Umwandlung des 17β-Androstendiols in die Metaboliten Östron, Östradiol, Androstendion und Testosteron nach 5-minütiger Inkubationszeit

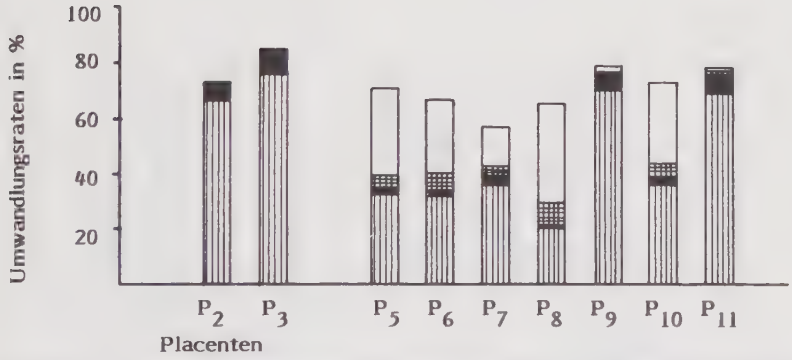


Abb. 8: Umwandlung des 17β-Androstendiols in die Metaboliten Östron, Östradiol, Androstendion und Testosteron nach 15-minütiger Inkubationszeit

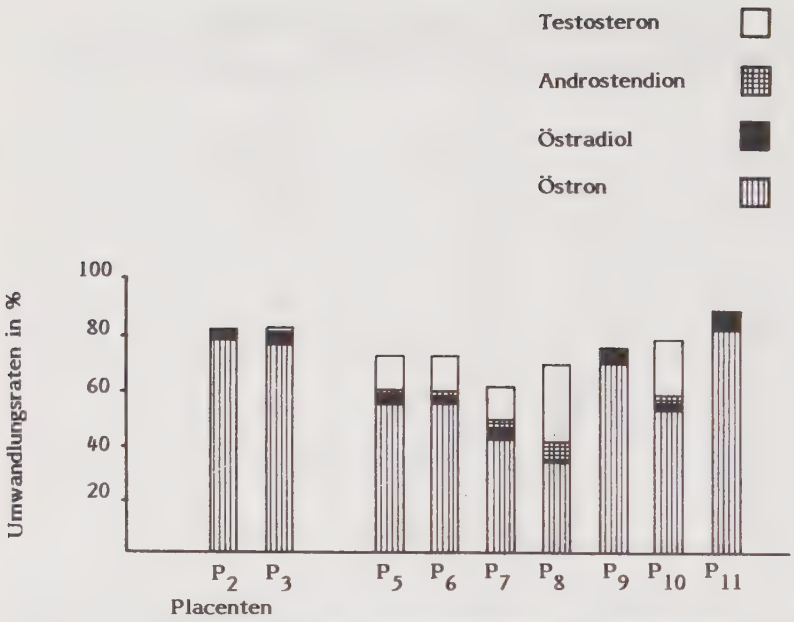


Abb. 9: Umwandlung des 17β-Androstendiols in die Metaboliten Östron, Östradiol, Androstendion und Testosteron nach 30-minütiger Inkubationszeit

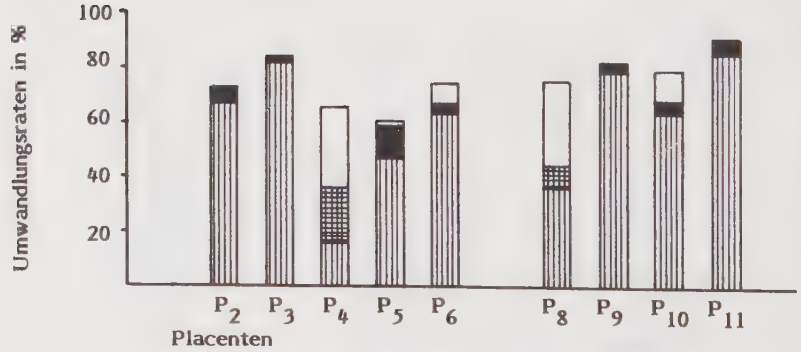


Abb. 10: Umwandlung des 17β-Androstendiols in die Metaboliten Östron, Östradiol, Androstendion und Testosteron nach 60-minütiger Inkubationszeit

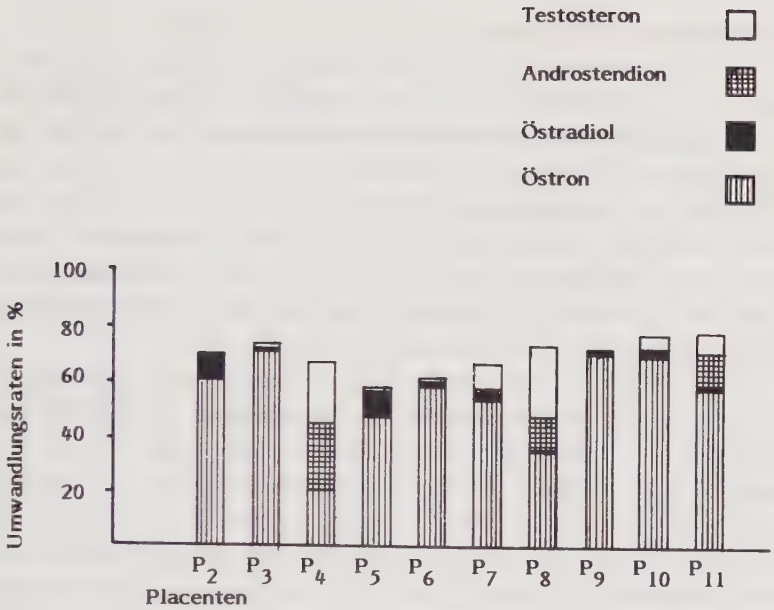


Abb. 11: Umwandlung des 17β-Androstendiols in die Metaboliten Östron, Östradiol, Androstendion und Testosteron nach 120-minütiger Inkubationszeit

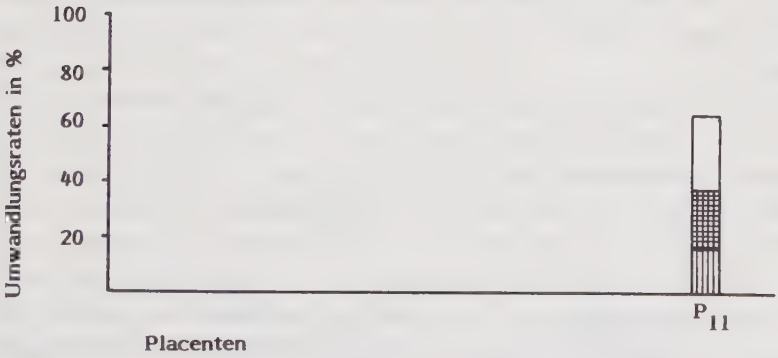


Abb. 12: Umwandlung des 17β-Androstendiols in die Metaboliten Östron, Östradiol, Androstendion und Testosteron nach 240-minütiger Inkubationszeit

V. Interpretation der Ergebnisse

Zunächst ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen, daß ein künstlich geschaffenes Untersuchungsmilieu vorliegt, das sich von den Verhältnissen in vivo deutlich unterscheidet.

So verbleiben die Reaktionsprodukte im System und können die für die jeweiligen Reaktionen verantwortlichen Enzymsysteme im Sinne einer "feedback"-Hemmung beeinflussen. Auch muß vor allem bei längerer Inkubationszeit mit einer zunehmenden Zerstörung der für die verschiedenen Reaktionen verantwortlichen Enzymsysteme gerechnet werden.

Trotz dieser Einschränkungen haben in vitro-Untersuchungen im Rahmen der Erforschung der Stoffwechselwege der Steroidhormone in verschiedenen menschlichen und tierischen Geweben einen beträchtlichen Beitrag zum besseren Verständnis dieser komplexen Reaktionen erbracht (s. Literaturüberblick).

Da die Anzahl der Versuche besonders auch im Hinblick auf die Zahl der isolierten Metaboliten für eine statistische Auswertung zu gering ist, wurde versucht, durch Interpretation der einzelnen Versuche die Metabolisierungswege des 17β-Androstendiols in der menschlichen Placenta aufzuzeigen.

Zu den in den einzelnen Versuchen angewendeten Methoden ist folgendes anzumerken: während die Methode mit internem Standard den zum Meßzeitpunkt vorliegenden prozentualen Anteil der Ausgangsradioaktivität in den einzelnen Metaboliten anzeigt, beschreibt die Doppelisotopenmethode, wieviel der Ausgangsradioaktivität über den Metaboliten Östradiol umgewandelt wurde.

Wie aus den graphischen Darstellungen und den Tabellen zu entnehmen ist, wird 17β-Androstendiol nach Zugabe zu dem Placentagewebe in hohem Prozentsatz verstoffwechselt (s. Tab. 40).

Zeigen sich bei den 5-Minuten-Werten noch deutliche Unterschiede in der Größe der Raten, so finden sich schon nach 15 Minuten vergleichbare Werte, die sich durch zunehmende Inkubationsdauer nur noch unwesentlich ändern. Auffallend ist hingegen die unterschiedliche Zusammensetzung dieser Raten aus den einzelnen Metaboliten. So zeigt sich, daß bei den Versuchen 2, 3, 9 und 11 schon nach 15 Minuten annähernd die gesamte Aktivität in Form östrogener Produkte vorliegt, während bei den übrigen Placenten neben

Östron und Östradiol ein erheblicher Prozentsatz an Androstendion und Testosteron isoliert werden kann, der sich mit zunehmender Inkubationsdauer in unterschiedlichem Maße in Östron und Östradiol umwandelt.
Bei der Interpretation dieser Ergebnisse wird von der Annahme einer unterschiedlichen Aktivität des Aromatasekomplexes in den einzelnen Placenten ausgegangen, und die Versuche werden je nach Aktivität dieses Komplexes in vier Gruppen eingeteilt:

I.	Placenten mit hoher Aromataseaktivität	P 2, 3, 9 und 11
II.	Placenten mit mittlerer Aromataseaktivität	P 5, 6, 7 und 10
III.	Placenten mit niedriger Aromataseaktivität	P 8
IV.	Placenten mit sehr niedriger Aromataseaktivität	P 4

Da in Versuch 1 eine direkte Umwandlung des 17β-Androstendiols zu Östradiol nicht nachgewiesen werden konnte und aufgrund der heutigen Kenntnisse über den chemischen Ablauf der Aromatisierungsreaktion auch nicht wahrscheinlich ist (s. 2.5.1.), wird von folgendem Reaktionsablauf ausgegangen:
17β-Androstendiol wird zunächst durch die 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase-Δ^5-Δ^4-Isomerase zu Testosteron umgewandelt. Dies wird durch unsere Versuche wie folgt verdeutlicht:

1. Während bei Placenten mit hoher Aktivität des Aromatasekomplexes nach 15-minütiger Inkubation nur noch minimale Testosteronmengen vorliegen, zeigt der bei Placenta 3 erhobene 5-Minuten-Wert einen Testosteronanteil von 13,88 %.
2. Die deutlich höheren Testosteronraten in Gruppe II - IV können aufgrund der geringeren Aktivität der Aromatase mit einem "Aufstau" des aus dem 17β-Androstendiol entstandenen Testosterons erklärt werden.

Die Weiterverstoffwechselung des Testosterons erfolgt nun entweder durch die 17β-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase zu Androstendion oder durch die Aromatase zu Östradiol.
Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, wird mit zunehmender Aktivität

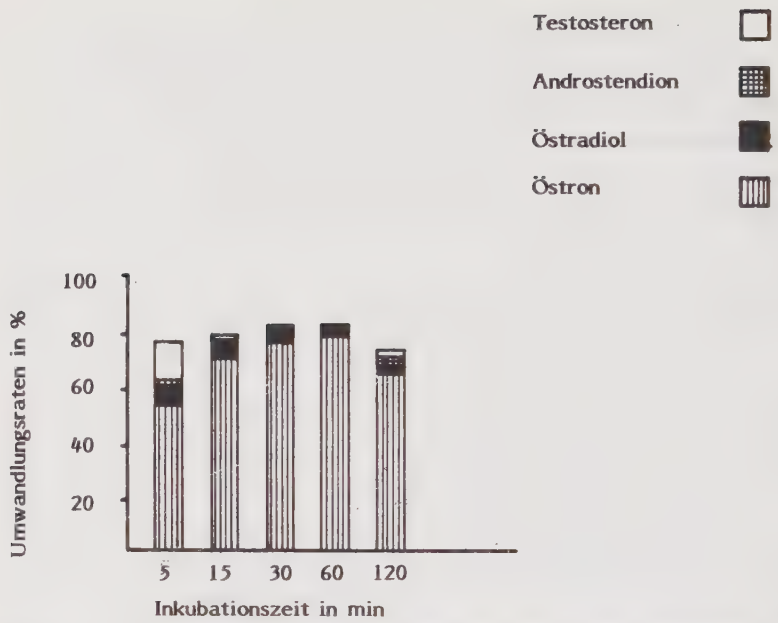


Abb. 13: Umwandlung des 17β-Androstendiols in die Metaboliten Östron, Östradiol, Androstendion und Testosteron nach verschiedenen Inkubationszeiten bei Gruppe I

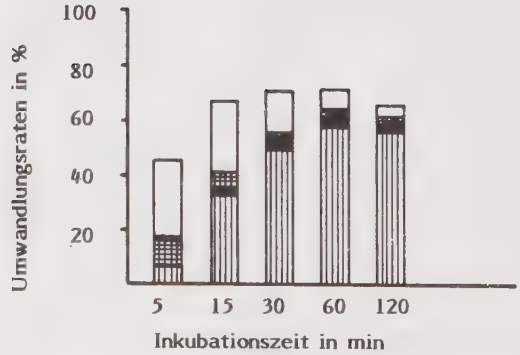


Abb. 14: Umwandlung des 17β-Androstendiols in die Metaboliten Östron, Östradiol, Androstendion und Testosteron nach verschiedenen Inkubationszeiten bei Gruppe II

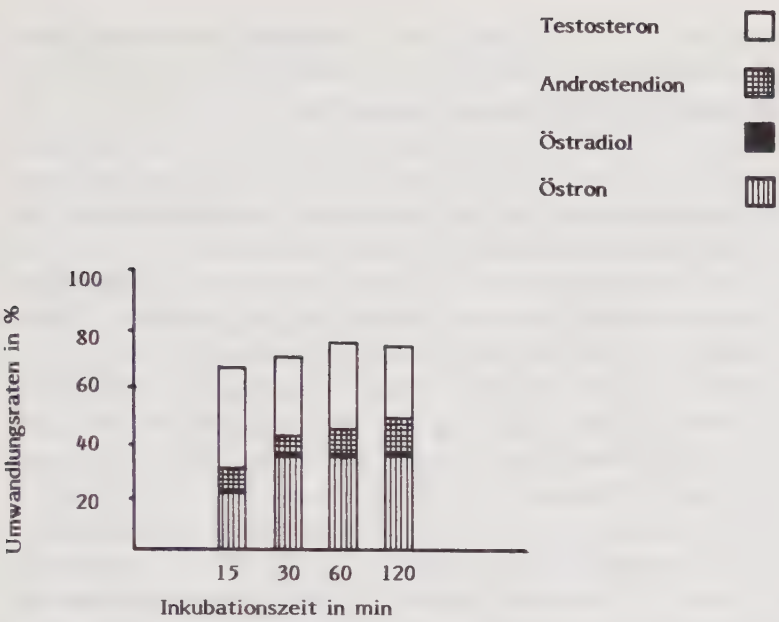


Abb. 15: Umwandlung des 17β-Androstendiols in die Metaboliten Östron, Östradiol, Androstendion und Testosteron nach verschiedenen Inkubationszeiten bei Gruppe III

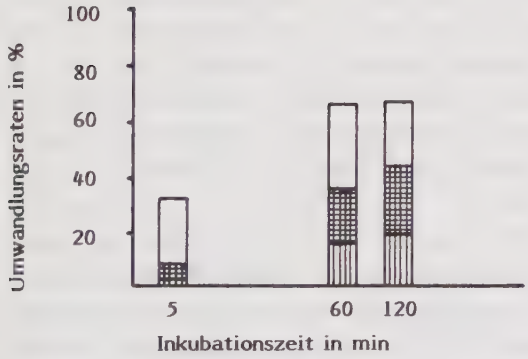


Abb. 16: Umwandlung des 17β-Androstendiols in die Metaboliten Östron, Östradiol, Androstendion und Testosteron nach verschiedenen Inkubationszeiten bei Gruppe IV

der Aromatase die Aromatisierung des Testosterons zu Östradiol gegenüber der Umwandlung von Testosteron zu Androstendion bevorzugt.
Dies kann folgendermaßen veranschaulicht werden:

1. Die bei Placenta 7 - 11 mit der Doppelisotopenmethode bestimmten Umwandlungsraten von 17β-Androstendiol zu Östradiol steigen mit zunehmender Aktivität der Aromatase eindeutig an.
2. Der bei der Methode mit internem Standard nach verschiedenen Inkubationszeiten ermittelte Anteil der Aktivität im Östradiol erhöht sich mit steigender Aktivität der Aromatase.
3. Bei verminderter Aktivität der Aromatase "staut" sich Testosteron (hoher Testosteronspiegel) auf, das dann langsam über Androstendion zu Östron verstoffwechselt wird, was sich am Anstieg des Androstendions von Gruppe I bis zu Gruppe IV zeigt.
4. Die in Gruppe I bei Placenta 9 und 11 durchgeführte Doppelisotopenmethode ergibt annähernd gleiche Ratios für Östron und Östradiol, während bei Placenta 7 und 10 (Gruppe II) sowie bei Placenta 8 (Gruppe III) die für Östron gemessenen Ratios deutlich höher ausfallen als die für Östradiol gemessenen.

Diese Ergebnisse beinhalten, daß bei Placenten mit hoher Aktivität des Aromatasekomplexes die dem Östradiol über Testosteron zukommende Aktivität in Östron umgewandelt wird, wobei das Gleichgewicht der Reaktion Östradiol ⇄ Östron eindeutig auf Seiten des Östrons liegt, wie aus den Versuchen mit der Methode mit internem Standard zu ersehen ist.
Mit abnehmender Aktivität des Aromatasekomplexes geht die dem Östron über Androstendion zufließende Aktivität in den Quotienten ^{3}H-Östron/^{14}C-Östron ein, der im Vergleich zu ^{3}H-Östradiol/^{14}C-Östradiol deutlich größer wird.
Folgende Faktoren müssen jedoch bei der Interpretation dieser Ergebnisse berücksichtigt werden (s. 3.3.8.): da sich der Metabolit ^{3}H-Östradiol in einem sog. Fließgleichgewicht befindet, ihm also von ^{3}H-17β-Androstendiol über Testosteron Aktivität zufließt, er sich jedoch gleichzeitig in ^{3}H-Östron umwandelt, während ^{14}C-Östradiol ebenfalls in ^{14}C-Östron verstoffwechselt wird, geht in die Rechnung je nach Aktivität der beteiligten Enzyme ein

unterschiedlich großer Fehler ein.

Im Idealfall wird ^{14}C-Östradiol so lange nicht weiterverstoffwechselt, bis sich der in der Methode mit internem Standard errechnete Anteil von 17β-Androstendiol zu ^{3}H-Östradiol umgewandelt hat. Würde dieser Quotient nun zu Östron umgewandelt, wären die Ratios identisch.

Da bei Placenta 9 und 11 mit der Doppelisotopenmethode annähernd gleiche Ratios für Östradiol und Östron gemessen wurden und diese dem Ausgangsquotienten ^{3}H-17 β -Androstendiol/^{14}C-Östradiol ziemlich nahekommen, ist eine Umwandlung des 17β-Androstendiols über Testosteron zu Östradiol und Östron anzunehmen.

Bei Placenten mit niedriger Aktivität der Aromatase scheint die Verstoffwechselung des Testosterons über Androstendion an Bedeutung zu gewinnen: Finden sich in Gruppe I nach 15 Minuten Testosteronmengen bis zu 2,02 %, so konnten bei Gruppe II nach derselben Zeit zwischen 14,81 % und 31,72 % und in Gruppe III bis zu 35,98 % Testosteron isoliert werden.

Testosteron wird nun langsam in Androstendion umgewandelt, was aus den mit zunehmender Inkubationsdauer geringer werdenden Testosteronmengen und im Vergleich zu Gruppe I in Gruppe II - IV eindeutig höheren Androstendionkonzentrationen zu ersehen ist.

Trotz geringerer Aktivität der Aromatase in Gruppe II - IV wird Androstendion im Vergleich zu Testosteron besser aromatisiert, was wiederum aus den im Vergleich zu ^{3}H-Östradiol/^{14}C-Östradiol höheren Ratios des Quotienten ^{3}H-Östron/^{14}C-Östron abgelesen werden kann.

Bei Placenta 4 mit sehr niedriger Aktivität der Aromatase findet man nach 30 Minuten ein Gleichgewicht zwischen Androstendion und Testosteron, das sich im Laufe der weiteren Inkubation nur noch unwesentlich verändert. Die in Gruppe I - IV parallel mit dem Anstieg des Testosterons bzw. verminderter Aktivität des Aromatasekomplexes abfallenden Verstoffwechselungsraten des 17β-Androstendiols zeigen das Vorliegen einer Gleichgewichtsreaktion zwischen 17β-Androstendiol und Testosteron an.

Mit Anstieg des Testosterons scheint die Verstoffwechselung des 17β-Androstendiols im Sinne einer "feed-back"-Hemmung gebremst zu werden.

Da die Verstoffwechselungsraten des 17 β-Androstendiols sich auch nach zweistündiger Inkubation nicht wesentlich verändern, scheint die Weiterverstoffwechselung der isolierten Metaboliten, besonders des quantitativ

bedeutsamsten, des Östrons, zunächst nicht von großer Bedeutung.
Eine interessante Feststellung ergibt sich jedoch aus der bei Placenta 11 zusätzlich durchgeführten 4-stündigen Inkubation mit beiden Methoden: der schon nach Beendigung der 2-stündigen Inkubation deutlich rückläufige Östron-Anteil betrug nach Abschluß der 4-stündigen Inkubation nur noch 15,68 %, wohingegen ein Anstieg der androgenen Produkte Testosteron und Androstendion beobachtet wurde, der sich zunächst in einem im Vergleich zu Testosteron deutlich höheren Androstendionanteil ausdrückte. Ob diese Ergebnisse als Nachweis einer bisher noch nicht beschriebenen Umkehrung der Aromatisierungsreaktion angesehen werden können, muß durch weitere Untersuchungen abgeklärt werden.
Die in Versuch 11 mit der Doppelisotopenmethode aufgezeigte gleichzeitig vorliegende Erniedrigung der Quotienten ^{3}H-Östron/^{14}C-Östron sowie ^{3}H-Östradiol/^{14}C-Östradiol könnte eine nicht über Östradiol ablaufende Weiterverstoffwechselung des Östrons zu Androstendion, das wie oben gezeigt vor Testosteron entsteht, bedeuten.
Inwiefern die hohe bei der Kristallisation des Östradiols in die Mutterflüssigkeit ausgeschiedene ^{3}H-markierte Aktivität einem Intermediärprodukt der rückläufigen Aromatisierungsreaktion zuzuordnen ist oder analog den ebenfalls bei Placenta 11 mit der Doppelisotopenmethode nach 30-minütiger Inkubation gezeigten erniedrigten Östron- und Östradiolratios einen möglichen Versuchsfehler anzeigt, kann nicht beantwortet werden.

VI. Diskussion

Die in unseren Versuchen erzielten, deutlich unterschiedlichen Umwandlungsraten des 17β-Androstendiols in Östradiol und Östron, wurden bei der Interpretation unserer Ergebnisse mit einer unterschiedlichen Aktivität des von Ryan[187] 1959 isolierten, den Mikrosomen (80 000 x g Präzipitat) zugeordneten Aromatasekomplexes erklärt.
Da Ryan[187] eine direkte Proportionalität zwischen dem mikrosomalen Protein und der Aromatisierungsrate angab, hätten die vorliegenden unterschiedlichen Umwandlungsraten durch unterschiedliche Proteingehalte in den Ansätzen bedingt gewesen sein können.
Eine von uns nach der Methode von Lowry et al.[134] durchgeführte Protein-

bestimmung ließ jedoch keine lineare Abhängigkeit zwischen Aromatisierungsrate und Proteingehalt erkennen, wenngleich die Placenten der Gruppe I mit durchschnittlich 5,55 mg/ml einen deutlich höheren Proteingehalt als die der Gruppe II mit 4,19 mg/ml aufwiesen und Placenta 4, die die niedrigste Aromatisierungsrate zeigte, lediglich einen Proteingehalt von 3,06 mg/ml ergab.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muß berücksichtigt werden, daß das von uns verwendete Homogenat einer Überstandsfraktion bei 2000 x g entsprach und damit neben dem mikrosomalen Enzym noch weitere Proteine umfaßte, so die von Ryan[187] der Überstandsfraktion bei 10000 x g zugeschriebenen Enzyme und Substrate für die Bildung und Reduktion des für die Aromatisierungsreaktion erforderlichen Coenzyms NADPH.

Lehmann und Lauritzen[123] konnten eine mit wachsendem Gestationsalter zunehmende Aktivität des Aromatasekomplexes aufzeigen und kamen bei ihren Studien über mögliche Ursachen der unterschiedlichen Aromatisierungsfähigkeit einzelner Placenten zu folgenden Ergebnissen: bei diabetischen Schwangeren, bei Schwangerschaften, die durch eine Gestose kompliziert wurden, und bei Übertragungen findet man eine deutlich erniedrigte Konversionsrate, wobei eine gute Korrelation zwischem dem Schweregrad der histologischen Veränderungen und den erniedrigten Konversionsraten besteht. Auch Rahman et al.[173] und Laumas et al.[120] berichteten über eine erniedrigte Konversionsrate bei Gestose-Schwangerschaften und Lehmann et al.[122] konnten eine signifikante Erniedrigung des mikrosomalen Enzyms der pathologischen Placenten im Vergleich zu gesunden aufzeigen. Die Autoren hatten zusätzlich das Ansteigen des mikrosomalen Enzyms im Verlaufe normaler Schwangerschaften beobachtet. Weiter gelang es Lehmann et al.[124], eine regional unterschiedliche Steroidbiosynthese innerhalb der materno-fetalen Strömungseinheiten zu zeigen: die niedrigere Enzymaktivität findet sich hierbei in den Zentren der Strömungseinheiten.

Da es sich in unserem Untersuchungsgut um zumindest makroskopisch durchweg normale, ausgereifte Placenten gesunder Probandinnen gehandelt hat, könnte neben leider nicht erfaßten histologischen Veränderungen lediglich noch die unkontrollierte Zusammensetzung des Homogenats aus peripheren und zentralen Anteilen der Kotyledonen die Aromatisierungsraten beeinflußt haben.

Zu erwähnen ist noch, daß bei einer Placenta der Gruppe I (P 3) ab der 38. Woche eine Tokolysebehandlung wegen Verdachts auf Placentainsuffizienz durchgeführt worden war, diese Placenta sich jedoch durch eine sehr hohe Aromataseaktivität auszeichnete.

Eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Geburtsdauer im Sinne einer mit zunehmender Geburtsdauer verminderten Enzymaktivität wäre denkbar, konnte jedoch bei unseren Untersuchungen nicht aufgezeigt werden.

Ob weitere untersuchungsspezifische Einflüsse auf die Aktivität der Enzyme eingewirkt haben, kann nicht ausgeschlossen werden.

Bei dem nun folgenden Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit denen anderer Autoren ist, neben eventuell unterschiedlichen Versuchsbedingungen wie Beschaffenheit des Inkubats, anderen Inkubationszeiten und unterschiedlichen Mengen der zugegebenen Steroide, die fehlende Zugabe jeglicher Cofaktoren sowie der zur Regeneration der Cofaktoren benötigten Substrate zu beachten. Es wurde davon ausgegangen, daß die für die verschiedenen Stoffwechselwege erforderlichen Enzyme ebenso wie die zur NADPH-Regeneration erforderlichen Substrate in genügender Menge im Homogenat enthalten sind.

6.1. Verstoffwechselung des 17β-Androstendiols

Die in den vorliegenden Untersuchungen nachgewiesene Umwandlung des 17β-Androstendiols zu Testosteron geschieht durch die 3β-Hydroxysteroid-dehydrogenase- Δ^5- Δ^4-Isomerase. Dieser Enzymkomplex, der die Umwandlung von Δ^5-3β-Hydroxysteroiden zu Δ^4-Ketosteroiden katalysiert[166,192], findet sich vor allem in der Mikrosomen- und Mitochondrienfraktion[114] vieler Gewebe, so auch der Placenta[114,166,192,235], und benötigt als Coenzym NAD oder NADP, wobei NAD wirkungsvoller ist.[114,235]

Schon 1945 konnte Turfitt[225] zeigen, daß 17β-Androstendiol von Bakterien zu Testosteron umgewandelt wird. Savard und Dorfman[193] beschrieben diesen Stoffwechselschritt mit Rattenhomogenat. Da aber diese Autoren noch nicht mit radioaktivem Material gearbeitet hatten, konnte die direkte Umwandlung, d.h. die Umwandlung ohne Zwischenprodukte, nicht bewiesen werden.

Dies gelang jedoch Baulieu et al.[14], die nach 3-stündiger Inkubation von Placentahomogenat mit 17β-Androstendiol 50 % Testosteron und nach Inkuba-

Tab. 47: **Umwandlung des 17 β -Androstendiols zu Testosteron in verschiedenen Geweben**

Autoren	Reaktionsort
Baulieu und Robel[13]	menschliche Blutbahn
Kirschner et al.[111]	menschliche Blutbahn
Pesonen et al.[164]	Postmenopausenovar
Pesonen und Saure[165]	Mäusehoden
Rosner et al.[179]	Kaninchenhoden
Rosner und Macome[180]	menschlicher Hoden
Slaunwhite und Burgett[208]	Rattenhoden

tion von Nebennierenrindentumorgewebe 15 % Testosteron isolieren konnten. Durch den Nachweis des ^{3}H-Atoms an Position 7 sowohl des 17β-Androstendiols als auch des Testosterons war die direkte Umwandlung bewiesen. Weitere Autoren (s. Tab. 47) konnten seitdem in unterschiedlichen Geweben verschiedener Spezies diesen Stoffwechselschritt in vivo und in vitro nachweisen.

Hierbei konnten mit unterschiedlichen Methoden in verschiedenen Geweben Umwandlungsraten bis zu 50 % erzielt werden. Eine Verstoffwechselung des 17β-Androstendiols zu Dehydroepiandrosteron erschien quantitativ unbedeutend.

Im Vergleich zu der einzigen uns bekannten Untersuchung über die Verstoffwechselung von 17β-Androstendiol in der menschlichen Placenta[14] erhielten wir deutlich höhere Werte. Während Baulieu et al.[14] Raten bis zu 50 % angeben, erzielten wir Raten bis zu 90 % (s. Tab. 40). Hierbei war die Höhe der Raten von der Weiterverstoffwechselung des Testosterons abhängig, was ein Reaktionsgleichgewicht zwischen 17β-Androstendiol und Testosteron voraussetzt. Da die in unseren Versuchen verwendete Hormonmenge von 0,3 µg/g Placentagewebe den in der Placenta gemessenen endogenen Hormonkonzentrationen vergleichbar ist[242], kann eine Verfälschung der Umwandlungsraten bedingt durch ein zu niedriges oder zu hohes Substratangebot weitgehend ausgeschlossen werden. Außerdem ist durch den Verzicht auf Zugabe von Cofaktoren ein weiterer die Untersuchungen beeinflussender Faktor ausgeschaltet worden.

6.2. Umwandlung von Testosteron zu Östradiol

Die in unseren Untersuchungen beschriebene Umwandlung von Testosteron zu Östradiol war von Ryan[187] 1959 nachgewiesen worden. Bevor jedoch die direkte Aromatisierung des Testosterons zu Östradiol aufgezeigt werden konnte, mußte zuvor die mit 17β-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase verunreinigte Mikrosomenfraktion mehrmals mit Puffer ausgewaschen und resedimentiert werden. Horn und Finkelstein[93] konnten ebenso wie Osawa[160] die direkte Umwandlung von Testosteron zu Östradiol in vitro und Bolté et al.[20] in vivo aufzeigen. Bellino und Osawa[16], die ebenso wie Ryan[187] eine im Vergleich zur Aromatisierung des Androstendions zu Östron niedrigere Umwandlungsrate des Testosterons in Östradiol aufzeigen konnten, nehmen folgendes Modell an: Der Aromatasekomplex besitzt zwei Seiten, auf der einen Seite besteht ein kompetitiver Verdrängungsmechanismus zwischen Androstendion und Testosteron um die Enzymbindung, auf der anderen Seite kann nur Androstendion gebunden werden.

Die von Braselton et al.[28] und von Milewich und Axelrod[146] isolierten Metaboliten 19-OH-Testosteron sowie 19-Oxo-Testosteron lassen auf einen der Aromatisierung des Androstendions zu Östron analogen Reaktionsablauf der Umwandlung von Testosteron zu Östradiol schließen.

6.3. Umwandlung von Testosteron zu Androstendion

Die in den vorliegenden Untersuchungen gezeigte Umwandlung von Testosteron zu Androstendion in der menschlichen Placenta erfolgt durch die 17β-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase.

Der im Cytoplasma enthaltene Enzymanteil wurde 1958 durch Langer und Engel[117] untersucht und von Jarabak et al.[101] 2500fach angereichert. Lehmann und Breuer[121] gelang es im Gegensatz zu Ryan[187], dieses Enzym zusätzlich aus der Mikrosomenfraktion der menschlichen Placenta zu isolieren.

Während der cytoplasmatische Anteil vorzugsweise mit aromatischen Steroiden reagiert - und hier insbesondere mit Östradiol[117] -, besitzt der mikrosomale Anteil keine ausgesprochene Substratspezifität, wandelt also auch neutrale Steroide wie Testosteron in das entsprechende Oxydationsprodukt um.[121] Wie Pollow et al.[169] zeigen konnten, wird jedoch 37 mal mehr Östradiol zu Östron als Testosteron zu Androstendion umgesetzt. Können

beide Enzyme sowohl mit NAD als auch mit NADP reagieren[101,117], zeigt das mikrosomale Enzym deutlich höhere Umsätze mit NAD.[121,169] Das pH-Optimum der Dehydrierung liegt bei 7,8, während die Hydrierung ein Optimum bei 6,4 zeigt[121] (vgl. K. Pollow und B. Pollow[168]).

Meyer[142] zeigte 1955 die Umwandlung von Testosteron zu Androstendion in der menschlichen Placenta. Weitere Untersuchungen in verschiedenen Geweben (s. 2.2.) sowie in der menschlichen Blutbahn[10,94] zeigten diesen Stoffwechselschritt. Charreau et al.[40], die diese Umwandlung mit Perfusionsversuchen an menschlichen Placenten darstellen konnten, zeigten, daß das Gleichgewicht dieser Reaktion eindeutig auf Seiten des Testosterons liegt. Bei Perfusionsversuchen mit menschlichen Feten erzielten Benagiano et al.[17,18] gleiche Ergebnisse.

Wie unsere Ergebnisse zeigen, hängt die Weiterverstoffwechselung des Testosterons von der Aktivität des jeweiligen Aromatasenzyms ab, wobei mit zunehmender Aktivität der Aromatase die direkte Umwandlung des Testosterons zu Östradiol der Umwandlung zu Androstendion vorgezogen wird.

Dies kann folgendermaßen erklärt werden: durch die Tätigkeit der 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase- Δ^5- Δ^4-Isomerase werden H-Atome frei, die gemäß Akhtar und Skinner[4] zur Regeneration des NADP benutzt werden können. Hierbei ist ein stereospezifischer Übergang des H-Atoms von Position 3 des 17β-Androstendiols auf NAD bzw. NADP anzunehmen, wie Jarabak und Talalay[102] sowie Warren et al.[234] dies bei der Oxydation des Östradiols und Inano und Tamaoki[98] in umgekehrter Weise bei der Reduktion des Androstendions aufgezeigt haben.

Inwiefern die von einigen Autoren[101,217,218] beschriebene Transhydrogenasefunktion der 17β-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase, die bei Anwesenheit katalytischer Östradiolmengen H-Atome von NADH auf NADP übertragen kann, bei der Zunahme der NADPH-Konzentration eine Rolle spielt, muß offengehalten werden. Das uns nicht bekannte Ausgangsverhältnis zwischen reduzierten und oxydierten Coenzymen - Glock und McLean[75] bestimmten das Verhältnis von NADPH bzw. NADH zu NADP bzw. NAD wie folgt: NAD + NADH > NADP + NADPH, wobei NAD < NADH und NADP > NADPH - würde sich zugunsten des ersteren erhöhen.

Da eine positive Korrelation zwischen der Menge an reduzierten bzw. oxy-

dierten Coenzymen und den reduktiven bzw. oxydativen Stoffwechselschritten besteht[27], wäre eine Bevorzugung der Umwandlung von Testosteron zu Östradiol, die NADPH erfordert[222], gegenüber der Oxydation des Testosterons, die NADP als Coenzym voraussetzt, anzunehmen. Zusätzlich könnte die von einigen Autoren[17,18,40] nachgewiesene durch unsere Versuche bestätigte Einstellung des Gleichgewichts der Reaktion Testosteron ⇄ Androstendion auf seiten des Testosterons die Verstoffwechselung des Testosterons über Östradiol positiv beeinflussen.

Die bei abnehmender Aktivität der Aromatase in den vorliegenden Untersuchungen aufgezeigte zunehmende Verstoffwechselung des Testosterons über Androstendion könnte durch den aufgrund der verminderten Verstoffwechselung des 17β-Androstendiols kleiner gewordenen Quotienten NADPH/NADP bzw. NADH/NAD erklärt werden. Zusätzlich ist die bei vermindertem Östradiol-Anfall weniger durch die Oxydation des Östradiols beanspruchte 17β-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase für die Verstoffwechselung des Testosterons vermehrt verfügbar.

6.4. Umwandlung von Androstendion zu Östron

Diese Reaktion wurde 1959 von Ryan[187] erstmals mit Placentamikrosomen nachgewiesen und seitdem von verschiedenen Autoren in unterschiedlichen Geweben dargestellt (s. 2.5.2.).

Wie aus unseren Untersuchungen zu ersehen ist, wird 17β-Androstendiol sowohl über Testosteron als auch über Androstendion zu Östron umgewandelt. Bei der in unseren Versuchen beschriebenen Verstoffwechselung des 17β-Androstendiols gewinnt die Aromatisierung über Androstendion zu Östron bei abnehmender Aktivität des Aromataseenzyms an Bedeutung. Hierbei ist eine deutlich bessere Aromatisierung des Androstendions zu Östron im Vergleich zur Aromatisierung von Testosteron zu Östradiol zu beobachten. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Ryan[187], Bellino und Osawa[16] sowie Mirhom und Szontágh[151] überein, die allesamt eine im Vergleich zu Testosteron bessere Aromatisierung des Androstendions angeben.

6.5. Umwandlung von Östradiol zu Östron

Ryan und Engel[183,184] zeigten 1953 die Fähigkeit verschiedener mensch-

licher Gewebe auf, Östradiol in Östron umzuwandeln. Bis auf die Testes, die mehr Östron in Östradiol umwandelten, lag das Gleichgewicht der Reaktion Östron ⇄ Östradiol eindeutig auf seiten des Östrons, wobei das Placentagewebe die bei weitem größten Umwandlungsraten aufwies.
Levitz et al.[128], die Placenten perfundierten, konnten ebenfalls eine hohe Umwandlungsrate von Östron zu Östradiol feststellen. Die Autoren fanden zusätzlich im Perfusat höhere Mengen von Östron (Östron : Östradiol = 2,5 : 1), während in der Placenta der Östradiol-Gehalt höher war (Östron : Östradiol = 1 : 2). Auch Bolté et al.[21,22] erhielten nach Perfusion der Placenta mit den Östrogenprekursoren Dehydroepiandrosteron, -sulfat, Testosteron und Androstendion im Perfusat einen höheren Östron-Anteil, während in der Placenta mehr Östradiol vorlag (vgl. Lamb et al.[119]). Diese Ergebnisse können nach Levitz et al.[128] mit einer eventuell bevorzugten Abgabe des Östrons aus der Placenta oder mit unterschiedlichen Konzentrationen der reduzierten und oxydierten Coenzyme in der Placenta und im Perfusat erklärt werden.
Jungblut[106] führt das in der Placenta im Gegensatz zu den Testes und den Ovarien auf seiten des Östrons liegende Gleichgewicht der Reaktion Östron ⇄ Östradiol auf den hohen Gehalt der Placenta an 17β-Hydroxysteroid-Oxydoreduktase zurück. Dieses in 6.3. beschriebene Enzym ist für die Umwandlung des Östradiols in Östron verantwortlich.
Wie nun aus unseren Untersuchungen zu entnehmen ist, können wir übereinstimmend mit den genannten Autoren die Einstellung des Gleichgewichts der Reaktion Östron ⇄ Östradiol auf seiten des Östrons aufzeigen.

In unseren Versuchen konnte unseres Wissens erstmalig eine Verstoffwechselung des 17β-Androstendiols zu Östrogenen in der menschlichen Placenta aufgezeigt werden, die in ihrer Größe den bekannten Östrogenprekursoren Dehydroepiandrosteron, -sulfat, Testosteron und Androstendion[21,22,23] vergleichbar ist.
Wie in 2.4.1. dargelegt, wäre aufgrund des Mangels der fetalen Nebennierenrinde an 3β-Hydroxyssteroiddehydrogenase-Δ^5-Δ^4-Isomerase[25] und dadurch ausschließlich über den Δ^5-Stoffwechselweg stattfindender Steroidsynthese ein Mehranfall des Metaboliten 17β-Androstendiol denkbar, da die von einigen Autoren[24,172] nachgewiesene Reaktion Dehydroepiandrosteron → 17β-Andro-

stendiol verstärkt ablaufen könnte. Das analog dem Dehydroepiandrosteronsulfat von der fetalen Nebennierenrinde abgegebene 17β-Androstendiol bzw. dessen Sulfat würde dann über den von uns beschriebenen Stoffwechselweg 17 β-Androstendiol (-Sulfat) → Testosteron → Östradiol → Östron bzw. 17β-Androstendiol (-Sulfat) → Testosteron → Androstendion → Östron umgewandelt werden.

Somit könnte die von Shackleton et al.[200] (s. 2.4.1.) aufgestellte These erhärtet werden, daß neben einer bevorzugten 16α-Hydroxylierung des 17β-Androstendiols in der fetalen Leber mit Aromatisierung zu Östriol in der Placenta[140] zusätzlich eine bevorzugte Aromatisierung des 17β-Androstendiols in der Placenta für die erniedrigten fetalen 17β-Androstendiol-Spiegel verantwortlich ist.

Um endgültige Aussagen über die quantitative Bedeutung dieses Stoffwechselschrittes in der Östrogensynthese der Schwangerschaft machen zu können, müssen jedoch noch weitere Messungen des 17 β-Androstendiolgehaltes in den Nabelschnurgefäßen sowie in der menschlichen Placenta vorliegen.

Die in der Einleitung beschriebene hohe Affinität des 17β-Androstendiols zu den Östradiolrezeptoren des Mammacarcinomgewebes kann, wie unsere Untersuchungen zeigen, nicht auf eine direkte Aromatisierung des 17β-Androstendiols zu Östradiol durch das Mammagewebe zurückgeführt werden. Da die Umwandlung des 17β-Androstendiols jedoch wie aufgezeigt über Testosteron erfolgt, dieses aber nur eine geringe Konkurrenz am Rezeptor entfaltet, könnte die Affinität des 17β-Androstendiols zu den Östradiolrezeptoren möglicherweise durch die Ähnlichkeit der chemischen Struktur (OH-Gruppe an Position 3 und 17) des 17β-Androstendiols mit dem Östradiol bedingt sein.

Die in der Einleitung beschriebene Erniedrigung des Dehydroepiandrosteronsulfatspiegels bei Frauen mit Mammacarcinom könnte dann durch den Verbrauch des mit dem Dehydroepiandrosteronsulfat im Gleichgewicht stehenden Metaboliten 17β-Androstendiol in der Tumorzelle erklärt werden.

VII. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung zweier Methoden (Methode mit internem Standard und Doppelisotopenmethode) mit insgesamt 16 Versuchen der Stoffwechsel des Δ^5-Androsten-3β,17β-diols in der menschlichen Placenta dargestellt.

Radioaktiv markiertes 17β-Androstendiol wurde mit menschlichem Placentagewebe inkubiert und nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden die Metaboliten Testosteron, Androstendion, Östradiol und Östron aus dem Gewebe extrahiert, durch Dünnschichtchromatographie und Kristallisation getrennt und gereinigt und die Radioaktivität der einzelnen Metaboliten mit einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer gemessen.

Hierbei konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

1. Die Verstoffwechselung des 17β-Androstendiols erfolgt abhängig von der Aktivität der Aromatase entweder über Testosteron zu Östradiol und weiter zu Östron oder über Testosteron zu Androstendion und Östron, wobei mit zunehmender Aktivität des Aromataseenzyms die Verstoffwechselung zunehmend über Testosteron zu Östradiol stattfindet.
2. Eine direkte Verstoffwechselung, d.h. eine direkte Aromatisierung des 17β-Androstendiols konnte nicht gezeigt werden, dies ist auch aufgrund der heutigen Kenntnisse über den chemischen Ablauf der Aromatisierungsreaktion unwahrscheinlich.
3. Die Verstoffwechselungsraten sind ebenfalls abhängig von der Aktivität des Aromataseenzyms: finden sich bei Placenten mit hoher oder sehr hoher Aktivität des Enzyms nach 5 Minuten Verstoffwechselungsraten des 17β-Androstendiols bis zu 76,58 % und nach 15 Minuten bis zu 85,14 %, so sieht man bei Placenten mit niedriger oder sehr niedriger Aktivität des Enzyms nach 5 Minuten Raten bis zu 31,08 % und nach 15 Minuten Raten bis zu 65,18 %.

   Bei Inkubationszeiten über 15 Minuten findet sich in allen Placenten keine oder nur noch eine unwesentliche Zunahme der Verstoffwechselungsraten des 17β-Androstendiols.
4. Ist bei Placenten mit hoher bzw. sehr hoher Aktivität des Aromataseenzyms schon nach 15 Minuten bis zu 98,48 % des 17β-Andro-

stendiols zu Östron und Östradiol verstoffwechselt, so sieht man bei Placenten mit mittlerer Aktivität bis zu einer Inkubationszeit von 120 Minuten einen kontinuierlichen Anstieg der Östrogene bis auf 97,79 %, während bei Placenten mit niedriger bzw. sehr niedriger Aktivität des Aromataseenzyms nach 30 Minuten Höchstraten bis zu 34,67 % vorliegen. Der Hauptanteil des verstoffwechselten 17β-Androstendiols wird hier zu Androstendion und Testosteron umgewandelt.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß die gesamte Ausgangsradioaktivität in den vier Metaboliten Testosteron, Androstendion, Östradiol und Östron vorliegt, so daß andere Metaboliten quantitativ keine große Rolle spielen können.

5. In einem Versuchsansatz (P 11) konnte nach 4-stündiger Inkubation eine deutliche Zunahme der Androgene Testosteron und Androstendion gesehen werden, während gleichzeitig der Anteil des Östrons und des Östradiols deutlich rückläufig war.

   Ob es sich hier um eine bisher noch nicht nachgewiesene Umwandlung von Östrogenen zu Androgenen handelt, muß durch weitere Untersuchungen nachgeprüft werden.

6. Mögliche Ursachen der unterschiedlichen Aktivität des Aromataseenzyms in den einzelnen Placenten konnten nicht aufgezeigt werden.

Durch unsere Versuchsreihe konnten unseres Wissens erstmalig Umwandlungsraten des 17β-Androstendiols zu Östrogenen angegeben werden, die denen der bekannten Östrogenprekursoren Dehydroepiandrosteron, Dehydroepiandrosteronsulfat, Testosteron und Androstendion vergleichbar sind. Um endgültige Aussagen über die Bedeutung des 17β-Androstendiols als Östrogenprekursor in der Schwangerschaft machen zu können, müssen jedoch noch weitere Untersuchungen vorliegen.

Die Bedeutung des 17β-Androstendiols bei der Genese des hormonabhängigen Mammacarcinoms könnte durch eine Konkurrenz am Rezeptor mit Östradiol aufgrund chemischer Strukturähnlichkeiten (OH-Gruppe an Position 3 und 17) bedingt sein, da eine direkte Umwandlung des 17β-Androstendiols in Östradiol nicht gezeigt werden konnte.

VIII. Literaturverzeichnis

1. Adams, J. B. and Wong, M. S. F. (1968)
Paraendocrine Behaviour of Human Breast Carcinoma: In vitro Transformation of Steroids to physiologically active Hormones
J. Endocrin. 41, S. 41-52

2. Adams, J. B. and Li, K. (1975)
Biosynthesis of 17β-Oestradiol in Human Breast Carcinoma Tissue and a novel Method for its Characterization
Br. J. Cancer 31, S. 429-433

3. Ahmad, N. and Gower, D. B. (1966)
The in Vitro Metabolism of Pregn-5-en-3β-ol-20-one by Rat Testicular Tissue. Formation of Δ^{16}-Steroids.
Steroids 7, S. 273-288

4. Akhtar, M. and Skinner, S. J. M. (1968)
The Intermediary Role of a 19-Oxoandrogen in the Biosynthesis of Oestrogen
Biochem. J. 109, S. 318-321

5. Allen, B. J., Hayward, J. L. and Merivale, W. H. H. (1957)
The Excretion of 17-Ketosteroids in the Urine of Patients with generalised Carcinomatosis secondary to Carcinoma of the Breast
Lancet I, S. 496-499

6. Alonso, C. and Troen, P. (1966)
Perfusion Studies of the Human Placenta. V. Metabolism of ^{3}H-Estrone ^{35}S-Sulfate and ^{14}C-Estradiol-17β at Mid-Pregnancy
Biochemistry 5, S. 337-343

7. Axelrod, L. R. and Goldzieher, J. W. (1962)
The Polycystic Ovary: III. Steroid Biosynthesis in Normal and Polycystic Ovarian Tissue
J. Clin. Endocrin. Metab. 22, S. 431-441

8. Axelrod, L. R., Matthijssen, Ch., Rao, P. N. and Goldzieher, J. W. (1965)
The Fate of Carbon-19 in the Course of Oestrogen Biosynthesis from Testosterone-19-^{14}C
Acta Endocrin. 48, S. 383-391

9. Baggett, B., Engel, L. L., Savard, K. and Dorfman, R. I. (1956) The Conversion of Testosterone-3-C^{14} to C^{14}Estradiol-17β by Human Ovarian Tissue
J. Biol. Chem. 221, S. 931-941

10. Bardin, C. W. and Lipsett, M. B. (1967)
Testosterone and Androstenedione Blood Production Rates in Normal Women and Women with Idiopathic Hirsutism of Polycystic Ovaries
J. Clin. Invest. 46, S. 891-902

11. Baulieu, E.-E. (1962)
Studies of Conjugated 17-Ketosteroids in a Case of Adrenal Tumor
J. Clin. Endocrin. Metab. 22, S. 501-510

12. Baulieu, E.-E. and Dray, F. (1963)
Conversion of H^3-Dehydroepiandrosterone (3β-Hydroxy-Δ^5-androsten-17-one) Sulfate to H^3-Estrogens in Normal Pregnant Women
J. Clin. Endocrin. Metab. 23, S. 1298-1301

13. Baulieu, E.-E. and Robel, P. (1963)
Androst-5-ene-3β,17β-diol-17α-^{3}H to Testosterone-17α-^{3}H and 5α and 5β-Androstane-3α,17β-diol-17α-^{3}H in vivo
Steroids 2, S. 111-118

14. Baulieu, E.-E., Wallace, E. and Lieberman, S. (1963)
The Conversion in Vitro of Δ^5-Androstene-3β, 17β-diol-17α-H^3 to Testosterone-17α-H^3 by Human Adrenal and Placental Tissue
J. Biol. Chem. 238, S. 1316-1319

15. Beatson, G. T. (1896)
On the Treatment of inoperable Cases of Carcinoma of the Mamma: Suggestions for a new Method of Treatment, with illustrative Cases
Lancet II, 1, S. 104-107

16. Bellino, F. L. and Osawa, Y. (1974)
Evidence of the direct Aromatization of Testosterone and different Aromatization Sites for Testosterone and Androstenedione in Human Placental Microsomes
Biochemistry 13, S. 1925-1931

17. Benagiano, G., Kincl, F. A., Zielske, F., Wiqvist, N. and Diczfalusy, E. (1967)
Studies on the Metabolism of C-19-Steroids in the Human Foeto-

Placental Unit
Acta Endocrin. 56, S. 203-220

18. Benagiano, G., Mancuso, S., Mancuso, F. P., Wiqvist, N. and Diczfalusy, E. (1968)
Studies on the Metabolism of C-19 Steroids in the Human Foeto-Placental Unit
Acta Endocrin. 57, S. 187-207

19. Bloch, E. and Newman, E. (1966)
Comparative Placental Steroid Synthesis. I. Conversion of (7-^{3}H)-Dehydroepiandrosterone to (^{3}H)-Androst-4-ene-3,17-dione
Endocrin. 79, S. 524-530

20. Bolté, E., Mancuso, S., Dray, F., Baulieu, E.-E. and Diczfalusy, E. (1964)
Conversion of Testosterone-17α-^{3}H into 17β-Estradiol-17α-^{3}H by Human Placentas perfused in situ
Steroids 4, S. 613-623

21. Bolté, E., Mancuso, S., Eriksson, G., Wiqvist, N. and Diczfalusy, E. (1964)
Studies on the Aromatisation of Neutral Steroids in Pregnant Women 1. Aromatisation of C-19 Steroids by placentas perfused in situ
Acta Endocrin. 45, S. 535-559

22. Bolté, E., Mancuso, S., Eriksson, G., Wiqvist, N. and Diczfalusy, E. (1964)
Studies on the Aromatisation of Neutral Steroids in Pregnant Women 2. Aromatisation of dehydroepiandrosterone and of its sulphate administered simultaneously into a uterine artery
Acta Endocrin. 45, S. 560-575

23. Bolté, E., Mancuso, S., Eriksson, G., Wiqvist, N. and Diczfalusy, E. (1964)
Studies on the Aromatisation of Neutral Steroids in Pregnant Women 3. Over-all aromatisation of dehydroepiandrosterone sulphate circulating in the foetal and maternal compartments
Acta Endocrin. 45, S. 576-599

24. Bolté, E., Wiqvist, N. and Diczfalusy, E. (1966)
Metabolism of Dehydroepiandrosterone and Dehydroepiandrosterone

Sulphate by the Human Foetus at Midpregnancy
Acta Endocrin. 52, S. 583-597

25. Bongiovanni, A. M. (1961)
Unusual Steroid Pattern in Congenital Adrenal Hyperplasia: Deficiency of 3β-Hydroxy Dehydrogenase
J. Clin. Endocrin. Metab. 21, S. 860-862

26. Boyd, S. (1900)
On Oöphorectomy in Cancer of the Breast
Br. Med. J. 2,2, S. 1161-1167

27. Braselton, W. E., Engel, L. L. and Orr, J. C. (1974)
The Flux of Intermediates and Products in Aromatization of C_{19} Steroids by Human Placental Microsomes
Eur. J. Biochem. 48, S. 35-43

28. Braselton, W. E., Orr, J. C. and Engel, L. L. (1974)
Identification by Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Intermediates in the Aromatization of modified C_{19} Steroids by Human Placental Microsomes
Steroids 24, S. 411-433

29. Braun-Cantilo, J. A., LaRoche, G., Novitsky, M. and Lawrence, J. H. (1962)
Conversion of Testosterone to Estrogens in Humans
Acta Isotopica Padova, S. 351-376

30. Breuer, H. und Ortlepp, R. (1960)
Zur Frage der verminderten Östrogenbildung in der Placenta nach Unterbrechung des fötalen Kreislaufes
Acta Endocrin. 35, S. 508-512

31. Breuer, H. und Grill, P. (1961)
Bildung von Formaldehyd bei der Aromatisierung neutraler Steroide zu phenolischen Steroiden
Hoppe-Seylers Z. Phys. Chem. 324, S. 254-261

32. Brodie, H. J., Kripalani, K. J. and Possanza, G. (1969)
Studies on the Mechanism of Estrogen Biosynthesis. VI. The Stereochemistry of Hydrogen Elimination at C-2 during Aromatization
J. Amer. Chem. Soc. 91, S. 1241-1242

33. Brodie, H. J., Pillai, A. K. and Hay, C. E. (1969)

Studies on the Mechanism of Estrogen Biosynthesis. VII. 2β-Hydroxylation of estr-4-ene-3,17-dione in Human Placenta in vitro
Biochim. Biophys. Acta 187, S. 275-277

34. Brownsey, B., Cameron, E. H. D., Griffiths, K., Gleave, E. N., Forrest, A. P. M. and Campbell, H. (1972)
Plasma Dehydroepiandrosterone Sulphate Levels in Patients with Benign and Malignant Breast Disease
Europ. J. Cancer 8, S. 131-137

35. Bulbrook, R. D., Hayward, J. L. and Salokangas, R. A. A. (1962)
The secretion rates of dehydroepiandrosterone and cortisol in patients with advanced breast cancer
Proceedings of the Society for Endocrinology, Eighty-Seventh Meeting, Cambridge, on 17-21 September 1962

36. Bulbrook, R. D., Hayward, J. L. and Spicer, C. C. (1971)
Relation between Urinary Androgen and Corticoid Excretion and Subsequent Breast Cancer
Lancet, S. 395-398

37. Callow, N. H., Callow, R. K. and Emmens, C. W. (1939)
The Effect of the Administration of Testosterone Propionate on the Urinary Excretion of Compounds allied to the Steroid Hormones
J. Endocrin. 1, S. 99-107

38. Cassmer, O. (1959)
Hormone Production of The Isolated Human Placenta
Acta Endocrin. 32, Suppl. 45, S. 9-82

39. Chakraborty, J., Thomson, J., MacSween, M. P., Muir, A. V., Calman, K. C., Grant, J. K. and Milne, J. A. (1970)
The in vitro Metabolism of 7α-^{3}H-Dehydroepiandrosterone by Human Skin
Br. J. Derm. 83, S. 477-482

40. Charreau, E., Jung, W., Loring, J. and Villee, C. (1968)
Biosynthesis of Estrogens by perfused full-term Placentas
Steroids 12, S. 29-40

41. Colás, A., LeRoy Heinrichs, W. and Tatum, H. J. (1964)
Pettenkofer Chromogens in the Maternal and Fetal Circulations: Detection of 3β,16α-Dihydroxy-Androst-5-en-17-one in Umbilical

Cord Blood
Steroids 3, S. 417-434

42. Colás, A. and LeRoy Heinrichs, W. (1965)
Pettenkofer Chromogens in the Maternal and Fetal Circulations: Anencephalic Pregnancies, Cesarean Sections, and Tentative Identification of 3β,17β-Dihydroxyandrost-5-en-16-one in Umbilical Cord Blood
Steroids 5, S. 753-764

43. Dell'Acqua, S., Mancuso, S., Eriksson, G., Ruse, J. L. Solomon, S. and Diczfalusy, E. (1967)
Studies on the Aromatisation of Neutral Steroids in Pregnant Women 6. Aromatisation of 16α-hydroxylated C-19 steroids by midterm placentas perfused in situ
Acta Endocrin. 55, S. 401-414

44. Demisch, K., Magnet, W., Neubauer, M. und Schöffling, K. (1972)
Über eine Erweiterung der Gonaden-Nebennierenrindendiagnostik durch gleichzeitige Messung von Testosteron, 5α-Dihydrotestosteron und Androstendiol im menschlichen Plasma
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 78, S. 1535-1537

45. Demisch, K., Magnet, W., Neubauer, M. and Schöffling, K. (1973)
Studies About Unconjugated Androstenediol in Human Peripheral Plasma
J. Clin. Endocrin. Metab. 37, S. 129-134

46. Desphande, N., Hayward, J. L. and Bulbrook, R. D. (1965)
Plasma 17-Hydroxycorticosteroids and 17-Oxosteroids in Patients with Breast Cancer and in Normal Women
J. Endocrin. 32, S. 167-177

47. Diczfalusy, E. (1960)
Endocrine Functions of the Human Placenta
Acta Endocrin., Suppl. 50, S. 129-134

48. Diczfalusy, E., and Borell, U. (1961)
Influence of oophorectomy on steroid excretion in early pregnancy
J. Clin. Endocrin. Metab. 21, S. 1119-1126

49. Diczfalusy, E., Cassmer, O., Alonso, C. and de Miquel, M. (1961)
Estrogen Metabolism in the Human Fetus and Newborn

Recent Progr. Horm. Res. 17, S. 147-206

50. Diczfalusy, E. and Troen, P. (1961)
Endocrine Functions in the Human Placenta
Vitamins and Hormones 19, S. 229-311

51. Diczfalusy, E. (1969)
Steroid Metabolism in the Human foeto-placental Unit
Acta Endocrin. 61, S. 649-664

52. Dorfman, R. I. and Hamilton, J. B. (1939)
The Urinary Excretion of Estrogenic Substances after the Administration of Testosterone Propionate
Endocrin. 25, S. 33-38

53. Dorfman, R. I. (1956)
Steroid Hormone Metabolism, S. 589-664
in: The Hormones. Physiology, Chemistry and Applications.
Ed. Pincus, G. and Thimann, K. V., New York, Academic Press, Vol. III

54. Dorfman, R. I. and Shiply, R. A. (1956)
in: Androgens, S. 116
Ed. Wiley, J. and Sons, New York

55. Dorfman, R. I., Gual, C., Morato, T., Hayano, M. and Gut, M. (1962)
Estrogen Biosynthesis by the Human Placenta. Internationaler Kongress über hormonale Steroide. Abstracts 1: Milano, May 1962 Excerpta Medica. International Congress Series 51, Abstract 270

56. Dorfman, R. I., and Dorfman, A. S. (1963)
Assay of Androgens Administered by Inunction to the Chick's Comb
Acta Endocrin. 42, Suppl. 74, S. 3-22

57. Easterling, W. E., Simmer, H. H., Dignam, W. J., Frankland, M. V. and Naftolin, F. (1966)
Neutral C_{19} Steroids and Steroid Sulfates in Human Pregnancy II. Dehydroepiandrosterone Sulfate, 16α-Hydroxydehydroepiandrosterone, and 16α-Hydroxydehydroepiandrosterone Sulfate in Maternal and Fetal Blood of Pregnancies with Anencephalic and Normal Fetuses
Steroids 8, S. 157-178

58. Eberlein, W. R. (1965)
Steroids and Sterols in Umbilical Cord Blood
J. Clin. Endocrin. Metab. 25, S. 1101-1118

59. Ehrenstein, M., Johnson, A. R., Olmsted, P. C., Vivian, V. I. and Wagner, M. A. (1950)
Investigations on Steroids. XI. New Transformation Products of Strophanthidin: Studies on Ethyl 3(β),5,19-Trihydroxyetiocholanate
J. Organ. Chem. 15, S. 264-291

60. Eik-Nes, K. B. and Kekre, M. (1963)
Metabolism in vivo of steroids by the canine testes
Biochim. Biophys. Acta 78, S. 449-456

61. Engel, L. L., Baggett, B. and Halla, M. (1958)
The formation of ^{14}C-labelled estriol from 16-^{14}C-estradiol-17β by human fetal liver slices
Biochim. Biophys. Acta 30, S. 435-436

62. Engelsman, E., Persijn, J. P., Korsten, C. B. and Cleton, F. J. (1973)
Oestrogen Receptor in Human Breast Cancer Tissue and Response to Endocrine Therapy
Br. Med. J. 2, S. 750-752

63. Fazekas, A. G. and Lanthier, A. (1971)
Metabolism of Androgens by isolated Human Beard Hair Follicles
Steroids 18, S. 367-379

64. Fishman, J., Bradlow, H. L. and Gallagher, T. F. (1960)
Oxidative Metabolism of Estradiol
J. Biol. Chem. 235, S. 3104-3107

65. Fishman, J., Bradlow, H. L., Zumoff, B., Hellman, L. and Gallagher, T. F. (1961)
Further Studies of the Metabolism of Oestradiol in Man
Acta Endocrin. 37, S. 57-62

66. Fishman, J., Brown, J. B., Hellman, L., Zumoff, B. and Gallagher, T. F. (1962)
Estrogen Metabolism in Normal and Pregnant Women
J. Biol. Chem. 237, S. 1489-1494

67. Fishman, J. and Guzik, H. (1969)

Stereochemistry of Estrogen Biosynthesis
J. Amer. Chem. Soc. 91, S. 2805-2806

68. Fishman, J., Guzik, H. and Dixon, D. (1969)
Stereochemistry of Estrogen Biosynthesis
Biochemistry 8, S. 4304-4309

69. Flores, F., Naftolin, F. and Ryan, K. J. (1973)
Aromatization of Androstenedione and Testosterone by Rhesus Monkey Hypothalamus and Limbic System
Neuroendocrin. 11, S. 177-182

70. Fotherby, K., Colás, A., Atherden, S. M. and Marrian, G. F. (1957)
The Isolation of 16α-Hydroxydehydroepiandrosterone (3β:16α-Dihydroxyandrost-5-en-17-one) from the Urine of Normal Men
Biochem. J. 66, S. 664-669

71. Fotherby, K. (1958)
The Isolation of 3β-Hydroxy-Δ^5-Steroids from the Urine of Normal Men
Biochem. J. 69, S. 596-600

72. Frandsen, V. A. and Stakemann, G.(1961)
The Site of Production of Oestrogenic Hormones in Human Pregnancy
Hormone excretion in pregnancy with anencephalic foetus
Acta Endocrin. 38, S. 383-391

73. Frandsen, V. A. and Stakemann, G.(1963)
The Site of Production of Oestrogenic Hormones in Human Pregnancy II.
Experimental investigations onthe role of the foetal adrenal
Acta Endocrin. 43, S. 184-194

74. Gardner, L. I., Walton, R. L., Ellis, W. and Hughes, E. C. (1951)
Diminished Plasma 17-Ketosteroid Concentration in Pregnancy
Soc. Exp. Biol. Proc. 86, S. 804-805

75. Glock, G. E. and McLean, P. (1955)
Levels of Oxidized and Reduced Diphosphopyridine Nucleotide and Triphosphopyridine Nucleotide in Animal Tissues
Biochem. J. 61, S. 388-390

76. Gordon, G. G., Olivo, J., Rafii, F. and Southren, A. L. (1975)
Conversion of Androgens to Estrogens in Cirrhosis of the Liver

J. Clin. Endocrin. Metab. 40, S. 1018-1026

77. Gual, C., Morato, T., Hayano, M., Gut, M. and Dorfman, R. I. (1962)
Biosynthesis of Estrogens
Endocrin. 71, S. 920-925

78. Gurpide, E., Angers, M., Vande Wiele, R. L. and Lieberman, S. (1962)
Determination of Secretory Rates of Estrogens in Pregnant and Nonpregnant Women from the Specific Activities of Urinary Metabolites
J. Clin. Endocrin. Metab. 22, S. 935-945

79. Hagen, A. A. and Eik-Nes, K. B. (1964)
Testosterone Biosynthesis in the Canine in vivo following Infusion of 17α-Hydroxy(4-^{14}C)Progesterone and (7α-^{3}H)Dehydroepiandrosterone via the Spermatic Artery
Biochim. Biophys. Acta 90, S. 593-599

80. Halban, J. (1905)
Die innere Sektretion von Ovarium und Placenta und ihre Bedeutung für die Funktion der Milchdrüse
Arch. Gyn. 75, S. 353-441

81. Hay, J. B. and Hodgins, M. B. (1971)
The androgen metabolism of human skin
J. Endocrin. 51: xxiii-xxiv

82. Hayano, M., Longchampt, J., Kelly, W., Gual, C. and Dorfman, R. I. (1960)
Studies on the Biosynthesis of Estrogens by Human Placental "Microsomes"
Acta Endocrin. 35, Suppl. 51, S. 699-700

83. Haynes, R. C., Mikhail, G., Eriksson, G., Wiqvist, N. and Diczfalusy, E. (1964)
Oestradiol Metabolism in the Previable Human Foetus and in the Foeto-Placental Unit
Acta Endocrin. 45, S. 297-320

84. Hayward, J. (1970)
Hormones and Human Breast Cancer

Rec. Res. Cancer Res. 24, S. 10-13

85. Hayward, J. (1970)
Hormones and Human Breast Cancer
Rec. Res. Cancer Res. 24, S. 33-37

86. Hayward, J. (1970)
Hormones and Human Breast Cancer
Rec. Res. Cancer Res. 24, S. 57-68

87. Heard, R. D. H., Jellinck, P. H. and O'Donnell, V. J. (1955)
Biogenesis of the Estrogens: The Conversion of Testosterone-4-C^{14} to Estrone in the Pregnant Mare
Endocrin. 57, S. 200-204

88. Hemsell, D. L., Grodin, J. M., Brenner, P. F., Siiteri, P. K. and MacDonald, P. C. (1974)
Plasma Precursors of Estrogen. II. Correlation of the Extent of Conversion of Plasma Androstenedione to Estrone with Age
J. Clin. Endocrin. Metab. 38, S. 476-479

89. Heyns, W. and De Moor, P. (1970)
Unconjugated androgens in plasma (different from testosterone) as studied by competitive protein binding
Ann. Endocrin. (Paris) 31, S. 811-816

90. Hirschmann, H. and Hirschmann, F. B. (1945)
Steroid Excretion in a Case of Adrenocortical Carcinoma. II. An Examination of the Non-Ketonic Fraction precipitable with Digitonin
J. Biol. Chem. 157, S. 601-612

91. Hirschmann, H., De Courcy, C., Levy, R. P. and Miller, K. L. (1960)
Adrenal Precursors of Urinary 17-Ketosteroids
J. Biol. Chem. 235, PC 48-49

92. Hobkirk, R. and Nilsen, M. (1960)
Six Estrogen Fractions in Human Pregnancy Urine
Acta Endocrin. 35, Suppl. 51, S. 1111-1112

93. Horn, H. and Finkelstein, M. (1971)
Aromatization of Epitestosterone by Human Placenta
Endocrin. 88, S. 271-273

94. Horton, R. and Tait, J. F. (1966)

Androstenedione Production and Interconversion Rates Measured in Peripheral Blood and Studies on the Possible Site of Its Conversion to Testosterone
J. Clin. Invest. 45, S. 301-313

95. Hoskins, W. H., Coffman, J. R., Koch, F. C. and Kenyon, A. T. (1939)
The Effect of Testosterone Propionate on the Urinary Excretion of Androgens and Estrogens in Eunuchoidism
Endocrin. 24, S. 702-710

96. Hoschoian, J. C. and Brownie, A. C. (1967)
Pathways for Androgen Biosynthesis in Monkey Testis
Steroids 10, S. 49-69

97. Hosoda, H. and Fishman, J. (1974)
Unusually Facile Aromatization of 2β-Hydroxy-19-oxo-4-androstene-3,17-dione to Estrone. Implications in Estrogen Biosynthesis
J. Amer. Chem. Soc. 96, S. 7325-7329

98. Inano, H. and Tamaoki, B. (1975)
Relationship between Steroids and Pyridine Nucleotides in the Oxido-Reduction Catalyzed by the 17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Purified from the Porcine Testicular Microsome Fraction
Eur. J. Biochem. 53, S. 319-326

99. Jackanicz, T. M. and Diczfalusy, E. (1968)
Absence of 16α-Hydroxylating Activity in the Human Midterm Placenta
Steroids 11, S. 877-884

100. Jaffe, R., Pion, R., Eriksson, G., Wiqvist, N. and Diczfalusy, E. (1965)
Studies on the Aromatisation of Neutral Steroids in Pregnant Women
Acta Endocrin. 48, S. 413-422

101. Jarabak, J., Adams, J. A., Williams-Ashman, H. G. and Talalay, P. (1962)
Purification of a 17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase of Human Placenta and Studies on Its Transhydrogenase Function
J. Biol. Chem. 237, S. 345-357

102. Jarabak, J. and Talalay, P. (1960)
Stereospecificity of Hydrogen Transfer by Pyridine Nucleotide-linked Hydroxysteroid Dehydrogenases
J. Biol. Chem. 235, S. 2147-2151

103. Jensen, E. V. and Jacobson, H. I. (1962)
Basic Guides to the Mechanism of Estrogen Action
Rec. Progr. Horm. Res. 18, S. 387-414

104. Jensen, E. V., Block, G. E., Smith, S., Kyser, K. and DeSombre, E. R. (1972)
Estrogen Receptors and Hormone Dependency, S. 23-57
in: Estrogen Target Tissues and Neoplasia
Ed. by Dao, T. L., The University of Chicago Press, Chicago and London

105. Jones, D., Cameron, E. H. D. and Griffiths, K. (1970)
Short Communications. Steroid Metabolism by Human Breast Tumours
Biochem. J. 116, S. 919-921

106. Jungblut, P. W. (1969)
Biosynthese und Stoffwechsel der Östrogene, S. 24-32
in: Östrogene und Hypophysentumoren
15. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie in Köln vom 6.-8. März 1969, Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. New York

107. Jungmann, R. A., Kot, E. and Schweppe, J. S. (1966)
In Vitro Synthesis of Estrogens by Midterm Human Placenta and Fetal Liver
Steroids 8, S. 977-992

108. Jungmann, R. A. and Schweppe, J. S. (1967)
Biosynthesis and Metabolism of Neutral Steroids by Human Mid-term Placenta and Fetal Liver
J. Clin. Endocrin. Metab. 27, S. 1151-1160

109. Kahnt, F. W., Neher, R., Schmid, K. and Wettstein, A. (1961)
Bildung von 17α-Hydroxy-Δ^5-pregnenolon und 3β-Hydroxy-17-keto-Δ^5-androsten (DHA) in Nebennieren- und Testes-Gewebe
Experientia 17, S. 19-21

110. Kase, N. and Cohn, G. L. (1967)

Clinical Implications of Extragonadal Estrogen Production
New Engl. J. Med. 276,1, S. 28-31

111. Kirschner, M. A., Sinhamahapatra, S., Zucker, I. R., Loriaux, L. and Nieschlag, E. (1973)
The Production, Origin and Role of Dehydroepiandrosterone and Δ^5-Androstenediol as Androgen Prehormones in Hirsute Women
J. Clin. Endocrin. Metab. 37, S. 183-189

112. Klausner, D. A. and Ryan, K. J. (1964)
Estriol Secretion by the Human Term Placenta
J. Clin. Endocrin. Metab. 24, S. 101-104

113. Klempien, E. J., Voigt, K. D. und Tamm, J. (1961)
Der Umsatz von Dehydroisoandrosteron in der Hundeleber
Acta Endocrin. 36, S. 498-510

114. Koide, S. S. and Torres, M. T. (1965)
Distribution of 3-β-Hydroxysteroid Dehydrogenase and Δ^5-3-Oxosteroid Isomerase in Homogenate Fractions of Human Term Placenta
Biochim. Biophys. Acta 105, S. 115-120

115. Laatikainen, T., Laitinen, E. A. and Vihko, R. (1969)
Secretion of Neutral Steroid Sulfates by the Human Testis
J. Clin. Endocrin. Metab. 29, S. 219-224

116. Laatikainen, T., Laitinen, E. A. and Vihko, R. (1971)
Secretion of Free and Sulfate-Conjugated Neutral Steroids by the Human Testis. Effect of Administration of Human Chorionic Gonadotropin
J. Clin. Endocrin. Metab. 32, S. 59-64

117. Langer, L. J. and Engel, L. L. (1958)
Human Placental Estradiol-17β Dehydrogenase. I. Concentration, Characterization and Assay
J. Biol. Chem. 233, S. 583-588

118. Lanman, J. T. (1953)
The Fetal Zone of the Adrenal Gland. Its Developmental Course, Comparative Anatomy, and Possible Physiologic Functions
Medicine 32, S. 389-430

119. Lamb, E., Mancuso, S., Dell Acqua, S., Wiqvist, N. and Diczfalusy, E. (1967)

Studies on the Metabolism of C-19 Steroids in the Human Foeto-Placental Unit. 1. Neutral metabolites formed from dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate by the placenta at midpregnancy
Acta Endocrin. 55, S. 263-277

120. Laumas, K. R., Malkani, P. K., Koshti, G. S. and Hingorani, V. (1968)
In vitro biosynthesis of estrogens in placentas from normal and toxemic pregnancies
Amer. J. Obstet. Gyn. 101, S. 1062-1067

121. Lehmann, W. D. und Breuer, H. (1967)
Charakterisierung und Kinetik einer mikrosomalen 17β -Hydroxysteroid-Oxydoreduktase der menschlichen Placenta
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, S. 1633-1639

122. Lehmann, W. D., Misinger, J. und Lauritzen, Ch. (1971)
Umwandlungsrate von (4-^{14}C)-Dehydroepiandrosteron in Oestron und Oestradiol-17β durch normale sowie Gestose- und Diabetes-Placenten
Arch. Gyn. 210, S. 49-60

123. Lehmann, W. D. und Lauritzen, Ch. (1973)
Aromatisierung von 4-^{14}C-Dehydroepiandrosteron zu Oestron und Oestradiol-17β durch Placenten von normalen und pathologischen Schwangerschaften
Arch. Gyn. 214, S. 436-438

124. Lehmann, W. D., Schuhmann, R. and Kraus, H. (1973)
Regionally different steroid-biosynthesis within materno-fetal circulation units (placentones) of mature human placentas
J. Perinat. Med. 1, S. 198-204

125. Lelong, M., Vandel, S., Borniche, P. et Jayle, M.-F. (1955)
Dosage des Oestrogènes dans le Placenta et les Organes d'Enfants morts à la Naissance
Ann. d'Endocrin. 12, S. 922-925

126. Leusden van, H. and Villee, C. A. (1965)
The de novo Synthesis of Sterols and Steroids from Acetate by Preparations of Human Term Placenta
Steroids 6, S. 31-45

127. Levitz, M., Condon, G. P. and Dancis, J. (1955)
Conversion of acetate-1-C^{14} to estradiol in perfused human placenta
Fed. Proc. 14, S. 245

128. Levitz, M., Condon, G. P. and Dancis, J. (1956)
The Interconversion of Estrone and Estradiol in the Perfused Human Placenta
Endocrin. 58, S. 376-380

129. Levitz, M., Emerman, S. and Dancis, J. (1962)
Sterol Synthesis in Perfused Human Placenta
Excerpta Medica. International Congress Series 51, S. 266

130. Leymarie, P. and Savard, K. (1968)
Steroid Hormone Formation in the Human Ovary. VI. Evidence for Two Pathways of Synthesis of Androgens in the Stromal Compartment
J. Clin. Endocrin. Metab. 28, S. 1547-1554

131. Longchampt, J. E., Gual, C., Ehrenstein, M. and Dorfman, R. I. (1960)
19-Hydroxy- Δ^4-Androstene-3,17-dione an Intermediate in Estrogen Biosynthesis
Endocrin. 66, S. 416-419

132. Longcope, C., Kato, T. and Horton, R. (1969)
Conversion of Blood Androgens to Estrogens in Normal Adult Men and Women
J. Clin. Invest. 48, S. 2191-2201

133. Loriaux, D. L. and Lipsett, M. B. (1972)
Radioligand Assay for Δ^5-3β-Hydroxysteroids. II. 5-Androstene-3β, 17β-diol and 3β,17α-Dihydroxy-5-Pregnen-20-one
Steroids 19, S. 681-688

134. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951)
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent
J. Biol. Chem. 193, S. 265-275

135. Maass, H., Engel, S., Hommelster, H., Lehmann, F. and Trams, G. (1972)
Estrogen receptors in human breast cancer tissue
Amer. J. Obstet. Gyn. 113, S. 377-382

136. Magendantz, H. G. and Ryan, K. J. (1964)

Isolation of an Estriol Precursor, 16α-Hydroxydehydroepiandrosterone, from Human Umbilical Sera
J. Clin. Endocrin. Metab. 24, S. 1155-1162

137. Mancuso, S., Dell'Acqua, S., Eriksson, G., Wiqvist, N. and Diczfalusy, E. (1965)
Aromatisation of Androstenedione and Testosterone by the Human Fetus
Steroids 5, S. 183-197

138. Mancuso, S., Benagiano, G., Dell'Acqua, S., Shapiro, M., Wiqvist, N. and Diczfalusy, E. (1968)
Studies on the Metabolism of C-19 Steroids in the Human Foeto-Placental Unit. 4. Aromatisation and hydroxylation products formed by previable foetuses perfused with androstenedione and testosterone
Acta Endocrin. 57, S. 208-227

139. Maner, F. D., Saffan, B. D., Wiggins, R. A., Thompson, J. D. and Preedy, J. R. K. (1962)
Interrelationship of Estrogen Concentrations in the Maternal Circulation, Fetal Circulation and Maternal Urine in Late Pregnancy
J. Clin. Endocrin. Metab. 23, S. 445-458

140. Manson, M. E., Shackleton, C. H. L., Kelly, R. W. and Mitchell, F. L. (1969)
Short Communications. The Preferential 16α-Hydroxylation of 17β- over 17α-Androstenediol when incubated with Foetal Liver in vitro
J. Endocrin. 45, S. 471-472

141. Mason, H. L. and Kepler, E. J. (1945)
Isolation of Androsterone, Etiocholan-3(α)-ol-17-one, and Δ^5-Androstene-3(β),17(α)-diol from the Urine after Administration of Dehydroisoandrosterone to a Man
J. Biol. Chem. 160, S. 255-264

142. Meyer, A. S. (1955)
Conversion of 19-hydroxy- Δ^4-androstene-3,17-dione to estrone by endocrine tissue
Biochim. Biophys. Acta 17, S. 441-442

143. Meyer, A. S. (1955)
19-Hydroxylation of Δ^4-Androstene-3,17-dione and Dehydroepiandro-

sterone by Bovine Adrenals
Experientia 11, S. 99-102

144. Migeon, C. J. and Plager, J. E. (1954)
Neutral 17-Ketosteroids in Human Plasma
Rec. Progr. Horm. Res. 9, S. 235-250

145. Migeon, C. J., Keller, A. R. and Holmstrom, E. G. (1955)
Dehydroepiandrosterone, Androsterone and 17-Hydroxycorticosteroid Levels in Maternal and Cord Plasma in Cases of Vaginal Delivery
Bull. Johns. Hopkins Hosp. 97, S. 415-421

146. Milewich, L. and Axelrod, L. R. (1971)
Metabolism of 4-[^{14}C]Testosterone by Lyophilized Baboon Placental Microsomes
Endocrin. 88, S. 589-595

147. Miller, A. M., Dorfman, R. I. and Miller, M. (1950)
Metabolism of the Steroid Hormones: Metabolism of Dehydroisoandrosterone
Endocrin. 46, S. 105-110

148. Miller, G. L. (1959)
Protein Determination for Large Numbers of Samples
Anal. Chem. 91, S. 664

149. Miller, W. R. and Forrest, A. P. M. (1976)
Oestradiol Synthesis by a Human Breast Carcinoma
Lancet, S. 866-868

150. Miller, W. R. and Forrest, A. P. M. (1976)
Short Communication. Oestradiol Synthesis from C19 Steroids by Human Breast Cancers
Br. J. Cancer 33, S. 116-118

151. Mirhom, Y. W. and Szontágh, F. E. (1972)
Kinetic Study of the Metabolism of [4-^{14}C] Dehehydroepiandrosterone by Normal Early Human Placental Tissue
I. Androgenic Derivatives
Steroids Lipids Res. 3, S. 160-169

152. Morato, T., Hayano, M., Dorfman, R. I. and Axelrod, L. R. (1961)
The Intermediate Steps in the Biosynthesis of Estrogens from Androgens

Biochem. Biophys. Res. Comm. 6, Nr. 5, S. 334-338

153. Morato, T., Raab, K., Brodie, H. J., Hayano, M. and Dorfman, R. I. (1962)
The Mechanism of Estrogen Biosynthesis
J. Amer. Chem. Soc. 84, S. 3764-3766

154. Naftolin, F., Ryan, K. J. and Petro, Z. (1971)
Aromatization of Androstenedione by the Diencephalon
J. Clin. Endocrin. Metab. 33, S. 368-370

155. Nathanson, I. T. and Towne, L. E. (1939)
The Urinary Excretion of Estrogens, Androgens and FSH Following the Administration of Testosterone to Human Female Castrates
Endocrin. 25, S. 754-758

156. Neher, R. and Wettstein, A. (1960)
Occurrence of Δ^5-3β -Hydroxysteroids in Adrenal and Testicular Tissue
Acta Endocrin. 35, S. 1-7

157. Nichols, J. (1956)
Observations on the Adrenal of the Premature Anencephalic Fetus
Arch. Path. (Chicago) 62, S. 312-317

158. Nieschlag, E., Loriaux, D. L. and Lipsett, M. B. (1972)
Radioligand Assay for Δ^5-3β -Hydroxysteroids
I. 3β-Hydroxy-5-Androstene-17-one And Its 3-Sulfate
Steroids 19, S. 669-679

159. Nimrod, A. and Ryan, K. J. (1975)
Aromatization of Androgens by Human Abdominal and Breast Fat Tissue
J. Clin. Endocrin. Metab. 40, S. 367-372

160. Osawa, Y. (1972)
Mechanism of Aromatization
in: Endocrinology, Proceedings of the Fourth International Congress. Ed. Scow, R. O., Washington D. C., Excerpta Medica, Amsterdam, S. 814-819

161. Patwardhan, V. V. and Lanthier, A. (1971)
The in vitro Formation of Androstenedione from C_{21} Steroids by Follicles Isolated from Human Ovaries

Acta Endocrin. 67, S. 698-710

162. Payne, A. H. and Mason, M. (1965)
Conversion of Dehydroepiandrosterone Sulfate to Androst-5-enediol-3-Sulfate by Soluble Extracts of Rat Testis
Steroids 6, S. 323-337

163. Pearlman, W. H., Cerceo, E. and Thomas, M. (1953)
The Conversion of Δ^5-Pregnen-3β-ol-20-one to Progesterone by Homogenates of Human Placental Tissue
J. Biol. Chem. 208, S. 231-239

164. Pesonen, S., Ikonen, M., Procopé, B-J. and Saure, A. (1968)
Androst-5-ene-3β,17β-diol in Ovary of Post-Menopausal Hyperoestrogenic Women. In vitro metabolism; histological and histochemical studies; clinical data of the patients
Acta Endocrin. 58, S. 364-376

165. Pesonen, S. and Saure, A. (1969)
Formation of testosterone and Δ^4-androstenedione from Δ^5-androstenediol in mouse testicular tissue in vitro
Ann. Acad. Sci. fenn. A, IV Biologica 154, S. 1-10

166. Pion, R., Jaffe, R., Eriksson, G., Wiqvist, N. and Diczfalusy, E. (1965)
Studies on the Metabolism of C-21 Steroids in the Human Foeto-Placental Unit. I. Formation of α,β-unsaturated 3-ketones in midterm placentas perfused in situ with pregnenolone and 17α-hydroxypregnenolone
Acta Endocrin. 48, S. 234-248

167. Plotz, E. J. (1971)
Oestrogene im Leben der Frau
Arch. Gyn. 211, S. 148-181

168. Pollow, K. und Pollow, B. (1971)
Nachweis und Charakterisierung eines mikrosomalen Enzyms aus menschlicher Placenta, das den Wasserstoff-Transfer zwischen C-17 von Östradiol und 4-Androsten-3,17-dion katalysiert
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, S. 1257-1266

169. Pollow, K., Sokolowski, G., Schmalbeck, J. und Pollow, B. (1974)
Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen und ihre Funktion als Katalysatoren

des spezifischen Wasserstoff-Transfers zwischen Steroidhormonen in Humanplacenta, II. Kinetische Untersuchungen und Wasserstoff-Transfer zwischen C-17 von Östradiol-17β und C-20 von Progesteron
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, S. 515-528

170. Poortman, J., Thijssen, J.H.H. and Schwarz, F. (1973)
Androgen Production and Conversion to Estrogens in Normal Postmenopausal Women and in Selected Breast Cancer Patients
J. Clin. Endocrin. Metab. 37, S. 101-109

171. Poortman, J., Prenen, J.A.C., Schwarz, F. and Thijssen, J.H.H. (1975)
Interaction of Δ^5-Androstene-3β,17β-diol with Estradiol and Dihydrotestosterone Receptors in Human Myometrial and Mammary Cancer Tissue
J. Clin. Endocrin.Metab. 40, S. 373-379

172. Pulkinnen, M.O. (1961)
Arylsulphatase and the Hydrolysis of some Steroid Sulphates in Developing Organism and Placenta
Acta Physiol. Scand. 52, Suppl. 180, S. 1-92

173. Rahman, S.A., Hingorani, V. and Laumas, K.R. (1975)
Biosynthesis of Oestrogens and their Inter-Conversion in Human Placentae from Normal and Toxaemic Pregnancies
Clin. Endocrin. 4, S. 333-341

174. Rice, B.F. and Savard, K. (1966)
Steroid Hormone Formation in the Human Ovary: IV. Ovarian Stromal Compartment; Formation of Radioactive Steroids from Acetate-1-^{14}C and Action of Gonadotropins
J. Clin. Endocrin. Metab. 26, S. 593-609

175. Robert, W. und Rathgen, G.H. (1963)
Über den Diphosphopyridinnucleotid-Gehalt der normalen menschlichen Placenta
Arch. Gyn. 198, S. 190-192

176. Roberts, K.D., Bandi, L., Calvin, H.I., Drucker, W.D. and Lieberman, S. (1964)
Evidence that Steroid Sulfates Serve as Biosynthesic Intermediates. IV. Conversion of Cholesterol Sulfate in vivo to Urinary C_{19} and C_{21} Steroidal Sulfates

Biochemistry 3, S. 1983-1988

177. Röhner, H. (1977)
Über den Einfluß von Clomiphen auf das 3β-ol-Dehydrogenase-Δ^5-Δ^4-Isomerase-System der menschlichen Plazenta
Inauguraldissertation, Tübingen

178. Rosenfield, R.L. and Otto, P. (1972)
Androstenediol Levels in Human Peripheral Plasma
J. Clin. Endocrin. Metab. 35, S. 818-822

179. Rosner, J.M., Horita, S. and Forsham, P.H. (1964)
Androstenediol, a Probable Intermediate in the in Vitro Conversion of Dehydroepiandrosterone to Testosterone by the Rabbit Testis
Endocrin. 75, S. 299-303

180. Rosner, J.M. and Macome, J.C. (1970)
Biosynthesis of 5-Androstenediol by Human Testis in Vitro
Steroids 15, S. 181-193

181. Rotter, W. (1949)
Die Entwicklung der fetalen und kindlichen Nebennierenrinde
Virchow's Arch. f. path. Anat. 316, S. 590-618

182. Roy, E. (1962)
The Concentration of Oestrogens in Maternal and Foetal Blood obtained at Caesarean Section, and the Effect of Hospitalization on Maternal Blood Oestrogen Levels
J. Obstet. Gyn. Brit. Comm. 69, S. 196-202

183. Ryan, K.J. and Engel, L.L. (1953)
The Interconversion of Estrone and Estradiol-17β by Rat Liver Slices
Endocrin. 52, S. 277-286

184. Ryan, K.J. and Engel, L.L. (1953)
The Interconversion of Estrone and Estradiol by Human Tissue Slices
Endocrin. 52, S. 287-291

185. Ryan, K.J. (1958)
Conversion of Δ^5-Androstene-3β-16α-17β-Triol to Estriol by Human Placenta
Endocrin. 63, S. 392-394

186. Ryan, K.J. (1958)

Conversion of androstenedione to estrone by placental microsomes
Biochim. Biophys. Acta 27, S. 658-659

187. Ryan, K. J. (1959)
Biological Aromatization of Steroids
J. Biol. Chem. 234, S. 268-272

188. Ryan, K. J. (1959)
Metabolism of C-16-oxygenated Steroids by Human Placenta: the Formation of Estriol
J. Biol. Chem. 234, S. 2006-2008

189. Ryan, K. J. (1963)
The Conversion of Pregnenolone-7-^{3}H and Progesterone-4-^{14}C to Oestradiol by a Corpus Luteum of Pregnancy
Acta Endocrin. 44, S. 81-89

190. Ryan, K. J. and Petro, Z. (1966)
Steroid Biosynthesis by Human Ovarian Granulosa and Thecal Cells
J. Clin. Endocrin. Metab. 26, S. 46-52

191. Ryan, K. J., Naftolin, F., Reddy, V., Flores, F. and Petro, Z. (1972)
Estrogen formation in the brain
Amer. J. Obstet. Gyn. 114, S. 454-460

192. Samuels, L. T., Helmreich, M. L., Lasater, M. B. and Reich, H. (1951)
An Enzyme in Endocrine Tissues which Oxidizes Δ^{5}-3 Hydroxysteroids to α,β unsaturated Ketones
Science 113, S. 490-491

193. Savard, K. and Dorfman, R. I. (1954)
Androgen Biosynthesis in Testicular Tissue (in vitro)
Rev. can. biol. 13, S. 495

194. Schenker, J. G., Polishuk, W. Z. and Eckstein, B. (1971)
Pathways in the Biosynthesis of Androgens in the Postmenopausal Ovary in Vitro
Acta Endocrin. 66, S. 325-332

195. Schindler, A. E. (1972)
Steroide im Fruchtwasser
Fortschr. Geb. Gynäk. 46, S. 1-89

196. Schindler, A. E., Ebert, A. and Friedrich, E. (1972)
Conversion of Androstenedione to Estrone by Human Fat Tissue

J. Clin. Endocrin. Metab. 35, S. 627-630

197. Schindler, A. E. (1975)
Steroid metabolism of fetal tissues
II. Conversion of androstenedione to estrone
Amer. J. Obstet. Gyn. 123, S. 265-268

198. Schneider, J. J. and Mason, H. L. (1948)
Studies on Intermediary Steroid Metabolism. I. Isolation of Δ^5-Androstene-3(β),17(α)-diol and Δ^5-Androstene-3(β),16(β),17(α)-triol Following the Incubation of Dehydroisoandrosterone with Surviving Rabbit Liver Slices
J. Biol. Chem. 172, S. 771-782

199. Shackleton, C. H. L. and Mitchell, F. L. (1967)
The Measurement of 3β-Hydroxy-Δ^5 Steroids in Human Fetal Blood, Amniotic Fluid, Infant Urine and Adult Urine
Steroids 10, S. 359-385

200. Shackleton, C. H. L., Livingstone, J. R. B. and Mitchell, F. L. (1968)
The Conjugated 17-Hydroxy Epimers of Δ^5-Androstene-3β-17β-diol in Infant and Adult Urine and Umbilical Cord Plasma
Steroids 11, S. 299-311

201. Siiteri, P. K. (1963)
The Isolation of Urinary Estrogens and Determination of Their Specific Activities Following the Administration of Radioactive Precursors to Humans
Steroids 2, S. 687-712

202. Siiteri, P. K. and MacDonald P. C. (1963)
The Utilization of Circulating Dehydroisoandrosterone Sulfate for Estrogen Synthesis During Human Pregnancy
Steroids 2, S. 713-730

203. Siiteri, P. K. and MacDonald, P. C. (1966)
Placental Estrogen Biosynthesis During Human Pregnancy
J. Clin. Endocrin. Metab. 26, S. 751-761

204. Siiteri, P. K., Tippit, P., Yates, C. and Porter, J. C. (1968)
A Double Isotope Procedure for the Determination of Progestins in Rat Ovarian Vein Blood
Endocrin. 82, S. 837-843

205. Simmer, H. H., Easterling, W. E., Pion, R. J. and Dignam, W. J. (1964)
Neutral C_{19}-Steroids and Steroid Sulfates in Human Pregnancy
I. Identification of Dehydroepiandrosterone Sulfate in Fetal Blood and Quantification of This Hormone in Cord Arterial, Cord Venous and Maternal Peripheral Blood in Normal Pregnancies at Term
Steroids 4, S. 125-135

206. Skinner, S. J. M. and Akhtar, M. (1969)
The Stereospecific Removal of a C-19 Hydrogen Atom in Oestrogen Biosynthesis
Biochem. J. 114, S. 75-81

207. Slaunwhite, W. R. and Samuels, L. T. (1955)
Progesterone as a Precursor of Testicular Androgens
J. Biol. Chem. 220, S. 341-352

208. Slaunwhite, W. R. and Burgett, M. J. (1965)
In Vitro Testosterone Synthesis by Rat Testicular Tissue
Steroids 6, S. 721-735

209. Slaunwhite, W. R., Karsay, M. A., Hollmer, A., Sandberg, A. A. and Niswander, K. (1965)
Fetal Liver as an Endocrine Tissue
Steroids Suppl. II, S. 211-221

210. Slaunwhite, W. R., Karsay, M. A., Niswander, K. and Sandberg, A. A. (1965)
Synthesis of Estrogens by Homogenates of Human Liver
Fed. Proc. 24, S. 384

211. Sobrevilla, L., Hagerman, D. and Villee, C. (1964)
The metabolism of pregnenolone and 17α -hydroxyprogesterone by homongenates of human term placentas
Biochim. Biophys. Acta 93, S. 665-667

212. Solomon, S., Bird, C. E., Ling, W., Iwamiya, M. and Young, P. C. M. (1967)
Formation and Metabolism of Steroids in the Fetus and Placenta
Rec. Progr. Horm. Res. 23, S. 297-347

213. Somma, M., Sandor, T. and Lanthier, A. (1969)
Site of Origin of Androgenic and Estrogenic Steroids in the Normal Human Ovary

J. Clin. Endocrin. Metab. 29, S. 457-466

214. Southren, A. L., Olivo, J., Gordon, G. G., Vittek, J., Brener, J. and Rafii, F. (1974)
The Conversion of Androgens to Estrogens in Hyperthyroidism
J. Clin. Endocrin. Metab. 38, S. 207-214

215. Steinach, E., Kun, H. and Peczenik, O. (1936)
Beiträge zur Analyse der Sexualhormonwirkungen. Tierexperimentelle und klinische Untersuchungen
Wiener Klin. Wochenschr. 29, S. 899-903

216. Steinach, E. and Kun, H. (1937)
Transformation of Male Sex Hormones into a Substance with the Action of a Female Hormone
Lancet II, S. 845

217. Talalay, P., Hurlock, B. and Williams-Ashman, H.G. (1958)
On a Coenzymatic Function of Estradiol-17β
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 44, S. 862-884

218. Talalay, P. and Williams-Ashman, H.G. (1958)
Activation of Hydrogen Transfer between Pyridine Nucleotides by Steroid Hormones
Proc. Nat., Acad. Sci. U. S. 44, S. 15-26

219. Talaly, P. (1965)
Enzymatic Mechanisms in Steroid Biochemistry
Ann. Rev. Biochem. 34, S. 347-380

220. Telegdy, G., Weeks, J.W., Lerner, U., Stakemann, G. and Diczfalusy, E. (1970)
Acetate and Cholesterol Metabolism in the Human Foeto-Placental Unit at Midgestation. 1. Sythesis of cholesterol
Acta Endocrin. 63, S. 91-104

221. Telegdy, G., Weeks, J.W., Wiqvist, N. and Diczfalusy, E. (1970)
Acetate and Cholesterol Metabolism in the Human Foeto-Placental Unit at Midgestation. 2. Steroids synthesized and secreted by the placenta
Acta Endocrin. 63, S. 105-118

222. Thompson, E. A. and Siiteri, P.K. (1973)
Studies on the Aromatization of C-19 Androgens

Ann. Ny. Acad. Sci. 212, S. 378-391

223. Townsley, J. D. and Brodie, J. H. (1968)
Studies on the Mechanism of Estrogen Biosynthesis. III. The Stereochemistry of Aromatization of C_{19} and C_{18} Steroids
Biochemistry 7, S. 33-40

224. Troen, P. (1961)
Perfusion Studies of the Human Placenta. II. Metabolism of C^{14}-17β-Estradiol with and without added Human Chorionic Gonadotropin
J. Clin. Endocrin. Metab. 21, S. 895-908

225. Turfitt, G. E. (1946)
The Microbiological Degradation of Steroids. 3. Oxidation of Hydroxy-Steroids to Keto-Derivatives by Proactinomyces Spp.
Biochem. J. 40, S. 79-81

226. Vande Wiele, R. L., MacDonald, P. C., Bolté, E. and Lieberman, S. (1962)
Precursors of the Urinary 11-Desoxy-17-ketosteroids: Estimation of the Secretory Rate of Dehydroisoandrosterone
J. Clin. Endocrin. Metab. 22, S. 1207-1221

227. Vande Wiele, R. L., MacDonald, P. C., Gurpide, E. and Lieberman, S. (1963)
Studies on the Secretion and Interconversion of the Androgens
Rec. Progr. Horm. Res. 19, S. 275-310

228. Venning, E. M. and Browne, J. S. L. (1936)
Isolation of a Water-Soluble Pregnandiol Complex from Human Pregnancy Urine
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 34, S. 792-793

229. Vihko, R. (1966)
Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Studies on Sovolyzable Steroids in Human Peripheral Plasma
Acta Endocrin. 52, Suppl. 109, S. 5-67

230. Villee, C. A. (1969)
Placenta and fetal tissues: A biphasic system for the synthesis of steroids
Amer. J. Obstet. Gyn. 104, S. 406-415

231. Vittek, J., Altman, K., Gordon, G. G. and Southren, A. L. (1974)

The Metabolism of 7α-^{3}H-Testosterone by Rat Mandibular Bone
Endocrin. 94, S. 325-329

232. Wang, D. Y. and Herian, M. (1973)
Plasma Dehydroepiandrosterone Sulphate and Breast Cancer
Acta Endocrin. Suppl. 177, S. 30

233. Warren, J. C. and Timberlake, C. E. (1962)
Steroid Sulfatase in the Human Placenta
J. Clin. Endocrin. Metab. 22, S. 1148-1151

234. Warren, J. C., González, M. C. and Soria, J. (1967)
Characteristics of the Steroid Binding Site: A Method To Evaluate Stereospecificity of Hydrogen Transfer by Steroid Dehydrogenases
Endocrin. 80, S. 784-788

235. Weidenfeld, J., Ben-Uzilio, R. and Ne'eman, Y. (1975)
Cofactor Requirements of Microsomal 3β-Hydroxy-Steroid Oxidoreductase,5-ene-Isomerase from Human Placenta
J. Steroid. Biochem. 6, S. 1243-1246

236. Weisz, J. and Gibbs, C. (1974)
Conversion of Testosterone and Androstenedione to Estrogens in Vitro by the Brain of Female Rats
Endocrin. 94, S. 616-620

237. West, C. D., Damast, B. L., Sarro, S. D. and Pearson, O. H. (1955)
Conversion of Testosterone to Estrogens in Castrated, Adrenalectomized Human Females
J. Biol. Chem. 218, S. 409-418

238. Wieland, R. G., De Courcy, C., Levy, R. P., Zala, A. P. and Hirschmann, H. (1965)
$C_{19}O_2$ Steroids and Some of Their Precursors in Blood from Normal Human Adrenals
J. Clin. Invest. 44, S. 159-168

239. Wilcox, R. B. and Engel, L. L. (1965)
Kinetic Studies on the Role of 19-Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione in Estrogen Biosynthesis
Steroids Suppl. 1, S. 49-57

240. Wotiz, H. H., Davis, J. W., Lemon, H. M. and Gut, M. (1956)
Studies in Steroid Metabolism. V. The Conversion of Testosterone-

4-C^{14} to Estrogens by Human Ovarian Tissue
J. Biol. Chem. 222, S. 487-495

241. Zelewski, L. and Villee, C.A. (1966)
The Biosynthesis of Squalene, Lanosterol, and Cholesterol by Minced Human Placenta
Biochemistry 5, S. 1805-1814

242. Zoch, E. (1966)
Zur Biochemie der menschlichen Placenta
Ann. Univ. Sarav. Vol. XIII, S. 1-110

243. Zondek , B. (1934)
Oestrogenic Hormone in the Urine of the Stallion
Nature 133, S. 494

Herrn Professor Dr. med. A. E. Schindler möchte ich für die Aufgabenstellung dieser Arbeit, seine stete Bereitschaft und Geduld ganz herzlich danken. Frau B. Lerch sei für die Hilfe bei der praktischen Durchführung der Versuche herzlich gedankt.

Lebenslauf

Am 29.9.1953 wurde ich, Elfriede Wecker, geb. Röhm, als zweites Kind des Walter Röhm, Schreinermeister, und seiner Ehefrau Frida, geb. Gayer, in Sulz am Eck/Württemberg geboren.

Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Grundschule in Sulz a.E., von 1964 bis 1972 das Schickhardt-Gymnasium in Herrenberg/Kreis Böblingen.

Nach Bestehen der Reifeprüfung 1972 begann ich im Wintersemester 1972/73 mit dem Medizinstudium an der Universität Tübingen.

Dort legte ich im Sommersemester 1974 das Physikum und im Sommersemester 1975 den Ersten Teil der Ärztlichen Prüfung ab.

Im Sommersemester 1977 setzte ich mein Studium an der Universität Göttingen fort. Dort bestand ich im Wintersemester 1977/78 den Zweiten Teil der Ärztlichen Prüfung.

Im Juni 1978 heiratete ich den Theologen Arthur Wecker aus Bielefeld.

Nach Absolvierung des Praktischen Jahres an den Universitätskliniken Göttingen und Bestehen des Dritten Teils der Ärztlichen Prüfung am 12. Juni 1979 war ich von Juni 1979 bis August 1981 in der Chirurgischen Abteilung des Evangelischen Krankenhauses Bad Gandersheim/Harz tätig. Von September 1981 bis September 1982 setzte ich meine Ausbildung in der Anästhesieabteilung des Zentral-Krankenhauses Bremen-Nord fort. Am 1. Oktober 1982 begann ich meine Ausbildung zum Facharzt für Innere Medizin in der Medizinischen Klinik des Diakoniekrankenhauses Rotenburg/Wümme.

Seit dem 1. April 1986 setze ich meine fachärztliche Ausbildung in der Medizinischen Klinik II der Städtischen Kliniken Braunschweig/Salzdahlumer Str. fort.